UNIVERSITE D'ALGER

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970 - N°

LE NUCLEOLE DANS LA CELLULE NORMALE ET DANS LA CELLULE CANCEREUSE

[Travail de la Chaire d'Histologie et d'Embryologie et de l'Institut de Biologie Cellulaire]
(Professeur S. SLIMANE-TALEB)

THESE

POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

présentée et soutenue publiquement le 1970

par

ALI-RACHEDI Abdesslem

né le 7 Décembre 1943 à ANNABA

Interne des Hôpitaux
Assistant d'Histologie et d'Embryologie

MEMBRES DU JURY

MM.	**Saïd SLIMANE-TALEB**, Professeur d'Histologie et d'Embryologie	PRESIDENT
	El-Hadi MANSOURI, Professeur de Pathologie Chirurgicale	JUGES
	Charef ZIDANE, Maître de Conférences - Agrégé d'Histologie et d'Embryologie	
	Abdenour YAKER, Maître de Conférences - Agrégé d'Anatomie Pathologique	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536513_0029

UNIVERSITE D'ALGER

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970 - N°

LE NUCLEOLE DANS LA CELLULE NORMALE ET DANS LA CELLULE CANCEREUSE

[Travail de la Chaire d'Histologie et d'Embryologie et de l'Institut de Biologie Cellulaire]
(Professeur S. SLIMANE-TALEB)

THESE

POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

présentée et soutenue publiquement le 1970

par

ALI-RACHEDI Abdesslem

né le 7 Décembre 1943 à ANNABA

Interne des Hôpitaux
Assistant d'Histologie et d'Embryologie

MEMBRES DU JURY

MM. **Saïd SLIMANE-TALEB**, Professeur d'Histologie et d'Embryologie — PRESIDENT

El-Hadi MANSOURI, Professeur de Pathologie Chirurgicale — JUGES

Charef ZIDANE, Maître de Conférences - Agrégé d'Histologie et d'Embryologie — JUGES

Abdenour YAKER, Maître de Conférences - Agrégé d'Anatomie Pathologique — JUGES

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

S E R M E N T D ' H I P P O C R A T E

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes Chers Condisciples et selon la tradition d'HIPPOCRATE, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la MEDECINE.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

JE DEDIE CETTE T H E S E :

- A MA MERE -

Dont l'affection, le dévouement et le sacrifice ont toujours été pour moi le plus précieux des présents.

***

- A MON PERE -

Dont la vie a toujours été synonyme de lutte. Il a été pour moi le meilleur des pères et le plus clairvoyant des maîtres.
A son esprit de lutte, de droiture et d'honnêteté, je jure de demeurer fidèle.

***

- A MES FRERES ET SOEURS -

- A TOUS LES MIENS -

Dont je fus le premier à avoir eu le privilège de fréquenter le Lycée d'abord,
l'Université ensuite.

****

NOUS DEDIONS CETTE THESE :

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

- MONSIEUR LE PROFESSEUR S.SLIMANE-TALEB -
Professeur d'Histologie et Embryologie

Monsieur,

Les mots nous manquent pour vous dire tout ce que vous représentez pour nous et tous nos camarades de promotion car nous savons tous que notre Faculté vous doit beaucoup et qu'il n'est pas exagéré de dire que sans vous cette Faculté n'aurait sans doute pas fonctionné convenablement.

Dès nos premières années d'études, vous avez exercé sur nous une fascination immense et vous avez su faire naître en nous notre vocation histologique.

Plus tard, vous nous avez accueilli dans votre équipe tant à la Faculté qu'à l'Institut de Biologie Cellulaire; c'est alors que nous avons pu mesurer la richesse de votre enseignement, votre vaste culture, votre rigueur scientifique et vos qualités pédagogiques.

Vous avez su être attentif à nos progrès et infiniment patient devant nos insuffisances. Vous nous avez enrichi de vos précieux conseils et raffermi dans notre voie par vos encouragements.

C'est trop peu que de vous remercier ou de vous assurer de notre gratitude. Aussi, préférons-nous vous dire notre ambition de nous montrer toujours digne de votre Enseignement.

A NOS J U G E S :

- MONSIEUR LE PROFESSEUR M A N S O U R I -

Nous avons eu l'honneur de vous compter parmi nos juges.

Vous montrez ainsi, à côté de votre grande compétence chirurgicale, un intérêt pour une discipline qui tend de plus en plus à se placer à l'avant-scène de la médecine.

Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

***

- MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE Z I D A N E -

Voici plus de deux ans que nous travaillons à vos côtés.

Chaque jour, vous avez su être à la fois le maître qui instruit inlassablement et l'ami qui encourage et stimule incessament.

Vous jouissez de qualités personnelles de bonté, de générosité et de désintéressement dont peu de gens peuvent faire état.

Votre talent de clinicien averti, votre très haute compétence hématologique, votre passion de la cancérologie nous ont fait aimer le travail à vos côtés.

Vous nous avez inspiré le sujet de ce travail dont la réalisation aurait été impossible sans votre participation.

En témoignage de notre reconnaissance et de notre profonde gratitude.

***

- MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE Y A K E R -

Nous n'oublierons pas l'accueil chaleureux que vous nous avez réservé lorsque nous sommes venu vous solliciter pour que vous siégiez à notre jury de thèse.

Nous connaissons votre intérêt pour la cancérologie et nous nous félicitons de vous compter parmi nos juges.

Recevez ici l'expression de notre sincère gratitude

***

- A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE BERERHI -

Nous avons bénéficié de votre enseignement théorique et pratique;
Et de vos judicieux conseils lors de notre initiation à la Microscopie Electronique.

Vous avez bien voulu nous aider dans la réalisation de notre iconographie en Microscopie Electronique.

En témoignage de notre reconnaissance.

***

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTE , et en particulier:

Monsieur le Professeur CARRICABURU

Monsieur le Professeur Agrégé MENTOURI

Monsieur le Professeur Agrégé LEHTIHET.

A TOUS NOS MAITRES DES HOPITAUX , et en particulier:

Monsieur le Professeur ZMERLI

Monsieur le Professeur Agrégé MOSTEFAI

Monsieur le Professeur Agrégé ILLOUL

Monsieur le Professeur Agrégé ISMAIL - DAHLOUK.

A NOS CONFERENCIERS D'INTERNAT :

Monsieur le Professeur Agrégé COLONNA

Monsieur le Professeur Agrégé CHAULET

Monsieur le Professeur Agrégé GRANGAUD

Monsieur le Docteur MEHDI.

***

A TOUS NOS AMIS , et en particulier :

Monsieur le Docteur BEKKAT-BERKANI Mammar

Monsieur le Docteur AIT-AMEUR Nacereddine

Monsieur et Madame TAYEBI

Messieurs LABLACK Madjid
RAFFAI Kaddour
BAGHRICH Mourad.

A TOUS NOS CAMARADES DE PROMOTION

AU PERSONNEL DU LABORATOIRE D'HISTOLOGIE ET EMBRYOLOGIE,
et en particulier :

Monsieur ALIOUALI Akli, pour sa précieuse collaboration.

AU PERSONNEL DE L'INSTITUT DE BIOLOGIE CELLULAIRE, et en particulier :

Monsieur BOUGHARE Idir.

****

Nous adressons nos vifs remerciements à toutes les personnes qui nous ont aidé dans la réalisation de cette thèse.

- T A B L E D E S M A T I E R E S -

Pages

- INTRODUCTION 2

- HISTORIQUE 5

- METHODES D'ETUDE 13

- DONNEES MORPHOLOGIQUES 28

- DONNEES BIOCHIMIQUES 42

- DONNEES BIOLOGIQUES 51

- LE NUCLEOLE DANS LA CELLULE MALIGNE . . . 77

- OBSERVATIONS PERSONNELLES 86

****

*
* *

-=- INTRODUCTION -=-

*
* *

On sait que parmi les critères de malignité en cytopathologie, on retient principalement l'hypertrophie et l'augmentation du nombre des nucléoles. Par ailleurs, on sait que le cancer se traduit essentiellement par une exagération de la protéosynthèse; le nucléole, dans celle-ci, joue un rôle majeur. Il est donc tentant de rechercher quelle est la responsabilité du nucléole dans le mécanisme de la cancérisation. En outre, on sait qu'il n'existe en Microscopie Optique aucun signe cytologique formel qui permette d'affirmer le cancer; les signes observés en Microscopie Optique ne sont en effet ni constants, ni spécifiques. Cependant, en ce qui concerne le nucléole, nous avons pensé que si la Microscopie Optique n'apporte rien, la Microscopie Electronique d'une part, grâce surtout aux techniques modernes de cytochimie ultrastructurale, les études biochimiques d'autre part, après isolement des nucléoles, sont susceptibles de fournir des renseignements essentiels.

Aussi allons-nous envisager dans ce travail deux problèmes :

1) Est-il possible d'observer à l'échelle ultrastructurale des lésions nucléolaires spécifiques du cancer? Quelles modifications éventuelles la thérapeutique fait-elle subir à ces lésions? Existe-t-il des anomalies biochimiques caractéristiques des nucléoles des cellules malignes?

2) Comment la connaissance du nucléole permet-elle d'interpréter les théories du cancer communément admises: théorie métabolique, théorie virale, théorie génétique?

Au préalable, il faudra examiner l'aspect et la signification du nucléole dans la cellule normale. Aussi, dans la première partie, nous étudierons le nucléole normal en envisageant successivement, après un rappel historique, les méthodes d'étude, les données morphologiques, les données biochimiques

et les données biologiques du nucléole.

Dans la seconde partie, nous verrons les aspects morphologiques et biologiques des nucléoles de la cellule cancéreuse; ce qui nous fournira les éléments permettant une approche des problèmes soulevés précédemment.

Enfin, dans la dernière partie, nous présenterons nos observations personnelles sur les nucléoles des cellules malignes qu'il nous a été donné d'analyser dans le Département de Cytologie Fonctionnelle et Expérimentale.

*

* *

*

* *

-=- H I S T O R I Q U E -=-

*

* *

L'histoire du nucléole commence en 1781 lorsque FONTANA décrit pour la première fois "une tâche" dans la cellule animale. Mais c'est BOWMAN (1840) qui crée le terme "nucléole". Entre temps, R. BROWN (1830) et DE MIRBEL (1831) découvrent le noyau.

En 1842, SCHLEIDEN émet sa célèbre théorie sur "la formation cellulaire libre". Selon cet auteur: "le nucléole est la première organelle à apparaître par différenciation dans un fluide formatif; dans ce dernier, des granules se condensent autour du nucléole, suivis de la condensation d'une membrane".

En 1896, PIANESE est le premier à avoir noté une hypertrophie nucléolaire dans les cellules néoplasiques.

Donc, en très peu de temps, le nucléole commence à intriguer les Biologistes : c'est ainsi que MONTGOMERY en 1898 reprend l'ensemble des idées de son époque dans une revue sur la morphologie nucléolaire comportant 700 références et, en 1900, VIGIER lui consacre sa thèse, publiée à Paris, sous le titre : "Le nucléole : Morphologie - Physiologie".

La fin du XIXème siècle est marquée par les travaux de très nombreux auteurs : FLEMMING, LENHOSSEK, LEVI, RUZICKA, SUMINARO décrivent des nucléoles hétérogènes. PURCELL, SCHAUDINN soulignent la présence de structures alvéolaires; tandis que BUTSCHLI, LEYDIG insistent sur l'aspect réticulé.

Plus intéressantes sont les recherches de RAMON Y CAJAL qui, grâce à des méthodes d'imprégnation à l'argent, décrit un nucléole complexe, filamenteux, dans les glandes salivaires de larves de Diptères (1895); cependant il hésite à exclure la possibilité d'artefacts (1921).

Peu à peu, la physiologie de cet organite se precise. WILSON écrit en effet en 1924 : "des observations commencent à

s'accumuler en faveur de la conclusion que les vrais nucléoles peuvent être impliqués dans les processus sécrétoires de la cellule" .

En 1934, MAC CLINTOCK clarifie pour la première fois les notions de complexe nucléolo-chromosomal et d'organisateur nucléolaire.

En 1935, GARDNER consacre une revue générale à la morphologie nucléolaire.

Les années suivantes sont marquées par les études biochimiques de CASPERSSON et SCHULTZ (1940), CASPERSSON (1941), BRACHET (1941).

En fait, l'impulsion décisive dans l'étude du nucléole est donnée dès 1951. A cette date, ESTABLE et SOTELO publient un très important rapport sur le "nucléole filamenteux". Sur un matériel normal varié, analysé aussi bien in vivo, en contraste de phase, qu'après imprégnation argentique, ces deux auteurs concluent que le nucléole est composé de deux parties : l'une constante, filamenteuse, le "nucleolonema" ; l'autre homogène mais inconstante, la "pars amorpha" . La même année, BORYSKO et BANG, aux U.S.A.; BERNHARD, HAGUENAU et OBERLING , en France, indépendemment les uns des autres, publient des images micro-électroniques de nucléoles dont la structure complexe et filamenteuse apparaît de façon spectaculaire.

En 1955, 1956 et 1957, le nucléole et l'objet d'importantes revues de VINCENT, de STICH et de HERTL.

En 1958, KOPAC et MATEYKO décrivent plusieurs exemples de nucléoles atypiques dans les cellules néoplasiques chez l'Homme et chez les Amphibiens.

Les revues de BOLOGNARI en 1959 - 1960 sont axées sur les structures nucléolaires alors que celle de SWIFT (1959)

insiste sur les fonctions nucléolaires.

Peu après, SIRLIN (1960, 1961, 1962) s'attache à faire connaître les aspects structuraux et biochimiques variés des nucléoles.

En 1961, OBERLING et BERNHARD montrent, au moyen des méthodes d'analyse disponibles à l'époque, que le nucléole de la cellule maligne n'offre pas de propriétés spécifiques directement associées avec la transformation néoplasique.

En 1963, BUSCH et collaborateurs consacrent une revue générale au nucléole de la cellule maligne. L'année suivante KOPAC et MATEYKO, publient un travail très documenté sur les chromosomes nucléolaires.

Enfin, en 1965 un Symposium International a eu lieu à MONTEVIDEO (URUGUAY) sur le thème : "Le nucléole : structure et fonctions" .

A la suite de ce symposium, malgré la somme considérable de faits accumulés, de nombreuses opinions demeurent contradictoires. Aussi, POLICARD (1967) a-t-il écrit non sans humour :

"Il y a cent quatre-vingt-six ans qu'on se demande à quoi exactement sert le nucléole. On peut attendre quelques années de plus. Toutefois, ce qui est certain, c'est qu'il sert à quelque chose" .

*

* *

P L A N G E N E R A L

-- Première Partie

Le nucléole dans la cellule normale

Méthodes d'étude

- Méthodes d'étude morphologique
  - . Microscopie Optique
  - . Microscopie Electronique
- Méthodes d'étude biochimique
- Méthodes d'étude physiologique

Données morphologiques

- Morphologie en Microscopie Optique
- Structure fine
- Variations physiologiques

Données biochimiques

- Composition chimique
- Equipement enzymatique

Données biologiques

- Evolution cyclique du nucléole
- Physiologie du nucléole
- Cytopathologie expérimentale du nucléole

-- Deuxième Partie

Le nucléole dans la cellule maligne

Données morphologiques

- Nombre
- Taille
- Forme
- Structure

Données biologiques

- Composition chimique
- Physiopathologie

Nucléole et théories de la carcinogénèse

- Théorie métabolique
- Théorie virale
- Théorie génétique

-- Troisième Partie

Observations personnelles

En Microscopie Optique

En Microscopie Electronique

PREMIERE PARTIE

*

* *

LE NUCLEOLE

DANS

LA CELLULE NORMALE

* *

*

*

* *

-=- M E T H O D E S D' E T U D E -=-

*

* *

P L A N

METHODES D'ETUDE MORPHOLOGIQUE

Microscopie Optique

1) In vivo

   a) Sans coloration
   b) Après coloration vitale et supravitale

2) Après fixation et coloration

   a) Frottis
   b) Coupes :
      - technique ordinaire
      - imprégnation argentique
      - technique immunologique
      - cytochimie.

Microscopie Electronique

1) In situ

   a) Technique ordinaire
   b) Cytochimie ultrastructurale.

2) Nucléoles isolés

METHODES D'ETUDE BIOCHIMIQUE

Techniques d'isolement des nucléoles

1) Méthode de sonication

2) Méthode de compression-décompression

Méthodes basées sur les propriétés chimiques des constituants

1) Méthodes d'analyse et de dosage biochimiques

2) Méthode des localisations cytochimiques

Méthodes basées sur les propriétés physiques des constituants

1) Spectrophotométrie et cytophotométrie

2) Méthodes basées sur les propriétés de fluorescence

3) Diffraction des rayons X

4) Méthodes utilisant les éléments radio-actifs : autohistoradiographie

METHODES D'ETUDE PHYSIOLOGIQUE

1) Micromanipulations

2) Traceurs isotopiques

*

* *

METHODES D'ETUDE MORPHOLOGIQUE

Microscopie Optique

1) In vivo

a) Sans coloration

L'examen vital du nucléole ne pose aucun problème technique; c'est l'un des organites les plus faciles à observer (GABE, 1968).

En pratique, on peut étudier à l'état frais des cellules in situ, des cellules cultivées en couche mince ou en suspension, des organismes unicellulaires de petite taille. L'observation peut se faire sur fond clair, sur fond noir, en microscopie interférentielle ou mieux encore en contraste de phase.

Soulignons l'intérêt de la photographie dans l'ultra-violet qui donne une meilleure définition des images et de la microcinématographie qui permet d'obtenir des renseignements d'ordre dynamique.

b) Après coloration vitale et supravitale

Quant à la coloration vitale ou supravitale, nous ne retiendrons que la coloration par l'orange d'acridine (BUKATSCH et HAITINGER, 1940; BRUGGER, 1942, 1950) dont la fluorescence secondaire fournit des indications sur la vitalité des cellules.

2) Après fixation et coloration

a) Frottis

C'est un procédé d'exécution rapide qui permet une première appréciation plus ou moins précise du matériel analysé.

Il présente un gros intérêt pour l'étude des éléments figurés du sang et des organes hématopoïétiques, de la cytologie des séreuses.

La fixation se fait par dessication dans la méthode panoptique de PAPPENHEIM (1910, 1911). Il est indiqué d'ajuster le pH de l'eau distillée utilisée pour la dilution des colorants :

- pH voisin de 6 pour la moelle osseuse;
- pH de 6,5 à 6,8 pour le sang (LILLIE, 1965).

Dans ces conditions, les noyaux sont colorés en rouge violacé et les nucléoles paraissent plus clairs.

Les autres colorations susceptibles d'être réalisées sur frottis n'admettent pas la fixation par dessication et sont d'une pratique plus difficile. Après fixation osmiée suivie d'une post-fixation dans l'alcool à 70° (GABE, 1968), on pourrait réaliser :

- la coloration régressive par l'hématoxyline
- la réaction de FEULGEN
- la coloration à la safranine-vert lumière
- la coloration au violet de gentiane.

GILLIS et BAIKIE (1964) conseillent une méthode utilisant un colorant acide le chromotrope 2R que l'on peut effectuer avec fixation par dessication suivie d'une post-fixation dans le méthanol. Cette méthode donnerait des résultats meilleurs que ceux de la méthode panoptique en ce qui concerne les leucémies (SALSBURY, 1967).

b) Coupes :

- technique ordinaire

La fixation peut se faire par cryodessication en utilisant le procédé de congélation-substitution (LISON, 1949) mais dans la pratique on a surtout recours à la fixation chimique.

Les fixateurs suivants peuvent être utilisés (GABE, 1968) : Ethanol à 95% ; Méthanol ; Formaldéhyde ; Liquide de BOUIN ; Liquide de ZENKER ; ZENKER-Formol ; Formol-Sublimé (Liquide de CAJAL) ; Liquide de CARNOY .

Formaldéhyde-Alcool absolu-Acide propionique ; Acide chromique à 1%.

Les coupes, à la paraffine, devront être minces.

Les colorations les plus courantes et leurs résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Méthode	Fixation	Chromatine	Nucléole
Azan de HEIDENHAIN	pas d'osmium ni de bichromate	rouge	rouge
Hématoxyline ferrique	alcoolique	noire	noir
Trichrome de MASSON	pas d'osmium	violet foncé	violet foncé
Tétrachrome de HERLANT	pas d'osmium ni de bichromate	bleu	rouge

Parmi les colorations mocochromes, retenons celles au bleu de méthylène ou à son homologue l'azur C, au GIEMSA, au bleu de cresyl brillant, à l'acéto-carmin (TANAKA, 1961). Signalons en outre la laque chromique de gallocyanine qui colore le nucléole ainsi que la chromatine en bleu-violet sur fond incolore.

- imprégnation argentique (*)

Une mention particulière doit être réservée à l'imprégnation argentique telle qu'elle a été utilisée par ESTABLE et SOTELO (1951, 1952) pour mettre en évidence le nucleolonema.

On fixe, pendant 4 à 24 heures, dans le mélange suivant :

Alcool à 95°	60 ml
Eau distillée	30 ml

(*) L'imprégnation argentique peut être réalisée en Microscopie Electronique (IZARD et BERNHARD, 1962; PAMELETZ, 1967).

Formol	5 ml
Ether sulfurique	5 ml
Nitrate d'uranyl	1 g

Ce mélange empêche la fixation concomittante de l'appareil de GOLGI.

Le nucleolonema est imprégné en noir sur fond jaune clair.

- technique immunologique

La morphologie nucléolaire peut également être révélée grâce à une technique particulière utilisant des anticorps anti-nucléolaires fluorescents (BECK, 1961, 1963 ; FENNEL et coll.,1962 ; RITCHIE, 1969). La localisation de la fluorescence représente le site de la réaction antigène-anticorps, mais l'étroite spécificité des anticorps ne permet pas de visualiser toute l'aire nucléolaire.

- cytochimie

. La réaction de FEULGEN et ROSSENBECK (1924) permet une différenciation entre structure nucléolaire et structure nucléaire non nucléolaire. La chromatine est colorée en rouge alors que le nucléole prend le colorant de fond (vert lumière et acide picrique du picro-indigo-carmin).

. La coloration de UNNA-BRACHET (1940, 1941) permet également une discrimination des structures nucléolaires et non nucléolaires. En effet, le nucléole est très fortement basophile du fait de sa richesse en acide ribonucleique (ARN) mais les protéines associées à cet ARN lui confèrent en même temps une acidophilie marquée. La coloration au vert de méthyle-pyronine fournit des préparations spectaculaires en donnant une coloration rouge des nucléoles qui tranche nettement sur le vert de la chromatine.

Les résultats des deux méthodes précédentes peuvent être contrôlées par extraction de l'ARN par la ribonucléase (ARNase), ou l'hydrolyse acide.

. Le bleu de toluidine molybdique (LOVE et LILES, 1955) peut être utilisé pour mettre en évidence la métachromasie nucléolaire ; le bleu de toluidine, après hydrolyse acide, pour révéler les structures chromatiniennes nucléolaires.

. Citons également la réaction au PAS pour laquelle le nucléole se montre positif. Cette réaction peut être couplée à la réaction de FEULGEN (réaction de HILES et MORIBER, 1956). L'acide désoxyribonucléique (ADN) est alors coloré en bleu, le nucléole PAS + en rouge et les protéines en jaune.

. Les réactions de mise en évidence des protéines sont nombreuses. Mentionnons :

+ la tétrazoréaction de DANIELLI (1947)
+ les réactions de détection de l'arginine (DEITCH, 1961) et de la tyrosine (BAKER, 1956)
+ la méthode à l'Alloxane-Schiff (YASUMA et ICHIKAWA, 1955)
+ les réactions de BARRNETT et SELIGMAN (1952) (protéines sulfhydrilées).

. La détection des histones a fait l'objet de nombreuses recherches (ALFERT et GESCHWIND, 1953; MIRSKY, POLLISTER et RIS, 1946; SERRA, 1946).

Microscopie Electronique

1) In situ

a) Technique ordinaire

La Microscopie Electronique est la méthode qui donne évidemment le plus de renseignements d'ordre morphologique, mais ses résultats doivent être interprétés avec prudence.

- La fixation à l'acide osmique (BAKER, 1958) tamponné par le tampon acétate-véronal de MICHAELIS (PALADE, 1952) ou mieux par le tampon de MILLONIG (1961) si elle préserve bien l'ensemble des structures cellulaires, conserve mal la chromatine (BAHR, 1957; GIBBONS et BRADFIELD, 1956). On pré-

fère actuellement :

= la fixation à la formaldéhyde suivie d'une post-fixation à l'acide osmique (MORGAN et coll., 1956) ou
= la fixation à la glutaraldéhyde suivie d'une post-fixation à l'acide osmique (SABATINI et coll., 1963, 1964; SANDBORN, 1964; TORMEY, 1964; LEDBETTER et GUNNING, 1964) ou bien
= une solution de glutaraldéhyde et d'acide osmique (TRUMP, 1966).

La fixation doit se faire à basse température (de 0 à 4°C) pour éviter une extraction des composants cellulaires.

- La déshydratation est fonction du milieu d'inclusion. Elle est faite généralement par passage dans l'alccol, ou l'acétone dans certains cas particuliers. Mais la déshydratation produit des modifications importantes du volume nucléaire (BAHR, 1957).

- L'inclusion peut se faire dans l'Araldite (GLAUERT et coll., 1956) ou mieux dans l'Epon 812, résine époxy, d'un maniement aisé (GIBBONS, 1959).

- La confection des coupes semi-minces et ultraminces ne pose plus de problèmes depuis l'apparition sur le marché d'ultramicrotomes perfectionnés (LKB par exemple).

- Les "colorants" (moyens de contraste) susceptibles d'être utilisés sont essentiellement :

= l'acétate d'uranyl (ZOBEL et MEER, 1961) qui a une grande affinité pour les acides nucléiques;
= divers sels de plomb (MILLONIG, 1961; KARNOVSKY, 1961; BJORKMAN et HELLSTROM, 1965) dont le plus stable paraît être le citrate (REYNOLDS, 1963; VENABLE et COGGESHALL, 1965).

- La technique habituelle comporte une fixation à la glutaraldéhyde ou à la formaldéhyde suivie d'une post-fixation à l'acide osmique et une double coloration à l'acétate

d'uranyl et à l'hydroxyde de plomb (FRASCA et PARKS, 1965) ou au citrate de plomb (REYNOLDS, 1963).

b) Cytochimie ultrastructurale

- La mise en évidence des acides nucléiques bénéficie de plusieurs méthodes :

= L'utilisation de métaux lourds (BERNSTEIN, 1956; HUXLEY et ZUBAY, 1961; ZOBEL et HEER, 1961; ALBERSHEIM et KILLIAS, 1963) n'a plus qu'un intérêt historique.

= Certaines méthodes permettent de diminuer le contraste des composants non nucléoprotéiques.

= En fait, seule la méthode des digestions enzymatiques (SWIFT, 1962) est d'un emploi général :

. L'inclusion dans l'Epon ne permet pas la digestion enzymatique. Aussi faut-il en général utiliser des résines hydrosolubles qui ne nécessitent pas de déshydratation préalable. On a recours dans ce but au glycol-méthacrylate (ROSENBERG et coll., 1960) ou mieux au Durcupan (STAUBLI, 1960); ce dernier cependant, pose des problèmes de coupe, car il donne des blocs assez mous.

. L'extraction des acides nucléiques est assurée par l'ADNase et l'ARNase; celle des protéines par la pepsine, la trypsine, ou mieux la pronase (MONNERON, 1966).

Signalons que l'ARNase augmente la densité des structures renfermant de l'ADN (YOTSUYANAGI, 1960, 1965) et l'ADNase celle des structures contenant de l'ARN (MONNERON, 1966; MENTRE, 1966, 1968).

Il est parfois utile de pratiquer des digestions combinées pronase-ARNase; pronase-ADNase ou l'inverse.

- La mise en évidence d'une activité enzymatique pose des problèmes très complexes en Microscopie Electronique.

La méthode de SMITH et FARQUHAR (1965) semble la plus satisfaisante. Elle comporte les temps suivants :

= fixation à la glutaraldéhyde
= coupes semi-minces (10 à 50 µ) suivies d'une incubation dans un milieu histochimique convenable à l'activité enzymatique recherchée
= post-fixation à l'acide osmique
= inclusion et coupes ultra-minces.

Enfin, il convient de mentionner à part une technique d'étude ultrastructurale particulière: le cryo-décapage. Cette méthode qui a l'avantage théorique de ne pas modifier la structure fine de la cellule, n'a pas permis jusqu'à présent de mettre en évidence, de façon indiscutable, le nucléole, de même d'ailleurs que les ribosomes (BERERHI et MALKANI, 1969).

2) Nucléoles isolés

Les nucléoles isolés peuvent bien entendu être étudiés avec les mêmes techniques que précédemment.

Cependant, dans certains cas, vu la taille des nucléoles, on peut se dispenser de la coupe. Il suffit de recueillir sur une grille une membrane-support de collodion de 100 Å d'épaisseur; on dépose ensuite sur cette membrane une gouttelette d'eau renfermant les nucléoles en suspension. Au cours de l'évaporation de l'eau, se produit une fixation par dessiccation et les nucléoles se retrouvent accolés à la membrane.

Il est possible alors soit d'examiner directement la préparation, soit de pratiquer un ombrage à l'or ou une coloration négative à l'acide phosphotungstique.

METHODES D'ETUDE BIOCHIMIQUE

Ces méthodes sont généralement mises en oeuvre sur des nucléoles isolés.

En effet, si l'isolement des nucléoles apporte des

renseignements morphologiques intéressants, il est absolument indispensable pour la connaissance de la composition chimique des nucléoles et pour la définition des fonctions nucléolaires en termes biochimiques.

Aussi allons-nous décrire tout d'abord les méthodes d'isolement des nucléoles avant d'aborder les méthodes d'étude biochimique proprement dites.

Techniques d'isolement des nucléoles

Il existe deux méthodes fondamentales d'isolement des nucléoles :

- l'une nécessitant au préalable l'isolement des noyaux : c'est la méthode de sonication ;
- l'autre permettant d'obtenir directement les nucléoles : c'est la méthode de compression-décompression.

1) Méthode de sonication

a) Isolement des noyaux

Deux procédés sont utilisables :

- celui de BEHRENS (1932, 1938) consiste en une flottation dans des systèmes de gradients de densité de solvants organiques.
- celui de CHAUVEAU (1952) consiste en une séparation par centrifugation à grande vitesse à l'équilibre de gravité spécifique : c'est le principe de l'ultracentrifugation différentielle (UCD). Lorsqu'on centrifuge dans un milieu aux gravités spécifiques graduées, il s'agit de la centrifugation en gradients de densité.

L'isolement des noyaux comporte 4 étapes principales :

- la préparation du tissu
- l'homogénéisation du tissu
- la sélection du milieu d'isolement
- l'UCD .

- La préparation du tissu tend à abaisser la teneur en sang du tissu pour éviter la sédimentation concomittante des hématies.

- L'homogénéisation est réalisée en deux étapes :

= la première, effectuée à l'aide d'une presse tissulaire, sert à débarrasser le tissu des éléments indésirables (fibres conjonctives, vaisseaux sanguins ...) ;

= la deuxième nécessite un homogénéisateur en verre avec piston en Téflon (dérivé du modèle original de POTTER et ELVEHJEM, 1936).

- Le milieu d'isolement le plus pratique est le saccharose hypertonique (CHAUVEAU et coll., 1956) à des concentrations supérieures ou égales à 2,0 M, additionné de faibles quantités d'ions Ca ou Mg, destinés à éviter l'agglutination des noyaux au cours de la sédimentation.

- L'UCD se fait généralement à 40 000 g pendant 1 heure.

La pureté des préparations doit être rigoureuse; elle doit être controlée en Microscopie Optique et en Microscopie Electronique ainsi que par analyse des enzymes cytoplasmiques de marquage (SIEBERT et coll., 1966).

b) Rupture des noyaux et purification des nucléoles

La sonication (MONTY et coll., 1956; MURAMATSU et coll., 1963; REES et coll., 1962; MAGGIO et coll., 1963) s'avère une très bonne méthode pour rompre les noyaux sans léser les nucléoles.

Le temps de sonication varie de 1 à 20 minutes, selon le procédé d'isolement des noyaux et selon la concentration en Ca du milieu (MURAMATSU et coll., 1963).

Pour la purification des nucléoles, on utilise l'ultracentrifugation en présence de saccharose (0,88 M) à 2 000 g (RO et coll., 1964).

L'isolement des nucléoles des tumeurs n'est pas toujours aussi aisé; il faut parfois se contenter d'une pureté relative.

En général, la technique de sonication est très satisfaisante; elle a même été adaptée à grande échelle pour l'isolement de grandes quantités de nucléoles (DESJARDINS et coll., 1965, 1966).

2) Méthode de compression-décompression

Cette méthode, due à DESJARDINS et coll. (1963), est de pratique plus délicate; elle fournit d'excellentes préparations. De plus, elle a l'avantage de ne pas nécessiter un isolement préalable des noyaux. L'homogénat total est directement soumis à la pression dans une cellule à pression spéciale. La purification des nucléoles se fait par centrifugation à 25 000 tours par minute pendant 10 à 20 minutes dans du saccharose à 2,2 M.

D'autres méthodes : pression combinée à un choc hypotonique (LIAU et coll., 1965); pression combinée à la sonication (MAC CONKEY et HOPKINS , 1964) n'ont que des applications limitées.

Méthodes basées sur les propriétés chimiques des constituants

1) Méthodes d'analyse et de dosage biochimiques

Une fois les nucléoles isolés, ils sont soumis aux méthodes usuelles d'analyse et de dosage biochimiques pour déterminer leur composition chimique.

2) Méthode des localisations cytochimiques

C'est le problème très délicat de la topochimie. Dans des cas assez rares, on a pu localiser une substance particulière ou une activité enzymatique sur des nucléoles in situ.

L'isolement des nucléoles simplifie grandement le problème, à condition toutefois de disposer de préparations très pures.

Méthodes basées sur les propriétés physiques des constituants

1) Spectrophotométrie et cytophotométrie

Ces deux méthodes ont été introduites par les travaux de CASPERSSON et de son Ecole (1936). La première donne des renseignements à la fois qualitatifs et quantitatifs, la seconde d'ordre qualitatif seulement.

2) Méthodes basées sur les propriétés de fluorescence

La détection de substances par fluorescence peut se faire directement; après marquage par un composé fluorescent; ainsi que par la méthode des anticorps fluorescents qui est théoriquement applicable à la Microscopie Electronique.

3) Diffraction des rayons X

Cette technique est d'un grand appoint pour l'étude des acides nucléiques, de la séquence des acides aminés et de la configuration spatiale des chaînes protéiques.

Ce procédé n'est pas dénué d'intérêt pour révéler certains éléments à poids atomique élevé et même pour en donner une appréciation quantitative.

4) Méthodes utilisant les éléments radio-actifs

La technique autohistoradiographique trouve naturellement sa place dans ce chapitre car elle fournit des renseignements d'ordre biochimique. Cette technique est susceptible d'être utilisée aussi bien en Microscopie Optique (LACASSAGNE et LATTES, 1934) qu'en Microscopie Electronique (LEDUIGOU-MILLARD, 1956; PELC, 1963; FROMME, 1964; CARO, 1964; MOSES, 1964; MOSS, 1965; ROHR et coll., 1965).

Pour l'étude du noyau, on utilise généralement le

tritium, le P^{32}, le C^{14}.

L'autohistoradiographie peut également être pratiquée sur des nucléoles isolés ou après digestion préalable.

METHODES D'ETUDE PHYSIOLOGIQUE

1) Micromanipulations

La transplantation de noyaux peut donner des informations essentielles sur la physiologie du nucléole (COMMANDON et DE FONBRUNE, 1939; DANIELI et coll., 1955; GOLDSTEIN et PLAUT, 1955; CHADWICK, 1961; IVERSON, 1962; BYERS et coll., 1963).

Il est même possible de combiner la transplantation au marquage isotopique (GOLDSTEIN, 1964).

2) Traceurs isotopiques

L'incorporation d'éléments radio-actifs peut non seulement être détectée par autohistoradiographie, mais également par la mesure de la radio-activité des fractions cellulaires; d'où l'intérêt capital de l'isolement des nucléoles.

Ainsi le nombre de méthodes d'étude susceptibles d'être appliquées au nucléole est considérable. La grande diversité de celles-ci doit inciter à une extrême prudence dans l'interprétation des résultats, obtenus le plus souvent avec un matériel et des techniques variés.

*

* *

*

* *

DONNEES MORPHOLOGIQUES

*

* *

P L A N

MORPHOLOGIE EN MICROSCOPIE OPTIQUE

Forme

Volume

Nombre

Structure

- Examen in vivo
- Après fixation et coloration
- Imprégnation argentique
- Cytochimie
  - = Réaction de FEULGEN
  - = Coloration de UNNA-BRACHET
  - = Coloration au bleu de toluidine

STRUCTURE FINE

Nucléoles in situ

- Nucléole vrai
- Chromatine nucléolo-associée

Nucléoles isolés

VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES

Variations de forme

Variations de volume

Variations de nombre

Variations de structure

*

* *

MORPHOLOGIE EN MICROSCOPIE OPTIQUE

Forme

La forme des nucléoles dépend étroitement des procédés utilisés pour leur observation . Sur certaines préparations, les nucléoles sont arrondis ou sphériques; mais sur d'autres, ils présentent une grande variabilité de forme (MONTGOMERY, 1898; JORGENSENS, 1913; KOPAC et MATEYKO, 1958). Les préparations les plus physiologiques de cellules ou de noyaux seraient les suspensions en solution saline, ou les cultures de tissus; dans ce dernier cas, les nucléoles sont fréquemment triangulaires avec des projections dont certaines s'étendent jusqu'à la membrane nucléaire (LETTRE et SIBBS, 1954, 1961).

Volume

Le volume nucléolaire moyen est déterminé sur 50 nucléoles; il est exprimé en microns cube (μ^3).

Lorsqu'il y a plusieurs nucléoles, il est intéressant de connaître le volume nucléolaire total par noyau; ce volume est déterminé sur 30 observations et exprimé en μ^3 (STENRAM, 1956, 1958).

Le rapport nucléolo-nucléaire est obtenu en multipliant par 1 000 le rapport des volumes moyens (*).

Dans ces conditions, on trouve pour le foie par exemple un volume nucléolaire moyen allant de 0,6 à 0,9 μ^3 alors que le volume nucléolaire total par noyau est de 1,7 à 2,1 μ^3.

(*) On doit déterminer également la déviation standard et l'erreur standard avant de chercher si les éventuelles différences observées sont significatives.

En fait, le volume du nucléole varie considérablement d'une cellule à l'autre et en fonction de l'activité métabolique.

Nombre

Le nombre de nucléoles est caractéristique de l'etat de jeunesse de la cellule. En principe, dans la plupart des cellules, il y a au moins un nucléole par noyau.

Dans la cellule hépatique normale, on compte approximativement 2 nucléoles par noyau avec un éventail de 1 à 6, voire même de 1 à 8 pour certains auteurs (FRACARRO et LINDSTEIN, 1959). Dans les lymphocytes humains normaux, il y a un nucléole par noyau chez l'adulte (GONZALES-GUZMAN, 1948, 1949; SMETANA, 1961; STOCKINGER et KELLNER, 1952) mais le nombre est plus élevé chez l'enfant. Dans les mégacaryocytes on peut trouver jusqu'à 40 nucléoles par noyau (HAENEL, 1951).

Dans les cellules en culture, le nombre de nucléoles dépend étroitement du milieu d'incubation (SWIFT, 1959).

Structure

- Examen in vivo

In vivo, après examen sur fond clair, sur fond noir ou en contraste de phase, on remarque à l'intérieur du noyau interphasique des cellules animales et végétales, une ou plusieurs masses, homogènes, très réfringentes : ce sont les nucléoles (SWIFT, 1962).

Ces derniers paraissent tantôt fluides, pouvant présenter des mouvements amiboïdes; tantôt très denses et rigides.

L'état physique du nucléole dépend, en effet, des

conditions chimiques d'observation (pH, ions hydratants ...(*)

- Après fixation et coloration

Après fixations et colorations courantes, le nucléole apparait comme une masse arrondie, acidophile. Fréquemment, on observe à la périphérie du nucléole des amas de chromatine, basophiles, connus sous le nom de chromatine nucléolo-associée (THORELL, 1944; CASPERSSON, 1941, 1950; BUSCH et coll., 1963).

Classiquement, on réserve le nom de vrai nucléole ou corps nucléolaire à la structure acidophile; celui de faux nucléole à la chromatine nucléolo-associée. On appelle nucléole mixte ou amphinucléole, l'association des deux structures.

La chromatine nucléolo-associée est constituée d'hétérochromatine (**).

- Imprégnation argentique

L'imprégnation argentique est une méthode de choix pour révéler la structure du nucléole. Déjà CAJAL (1893) observe une structure filamenteuse. Plus tard, ESTABLE et SOTELO (1951) précisent cette notion. Ces deux auteurs mettent en évidence, grâce à une technique d'imprégnation argentique, un filament argyrophile le "nucleolonema" et une matrice homogène la "pars amorpha".

Le nucleolonema est une structure permanente qui

(*) On a parfois été amené à discuter de l'identité des corpuscules observés in vivo en contraste de phase, avec ceux observés après les colorations courantes. Cependant, les techniques d'isolement des nucléoles ont levé tous les doutes en montrant que les particules isolées, non seulement ressemblent celles observées in situ, mais prennent également les colorants nucléolaires.

(**) L'hétérochromatine (ou basichromatine ou leptochromatine, fortement colorable, est la substance constitutive des caryosomes. On l'oppose classiquement à l'euchromatine qui est diffuse et peu colorable.

persiste même au cours de la mitose (ESTABLE et SOTELO, 1954). Cependant, BOLOGNARI (1959) n'admet pas la présence d'un nucleolonema continu et constant dans tous les nucléoles. (*)

PAVELETZ et coll. (1967) ont une opinion plus nuancée, car l'imprégnation argentique dépend du fixateur utilisé. Après fixation au formol, ils observent des structures en rosace.

Pour DAS (1962) l'argent se dépose au niveau d'un composant nucléolaire de nature protéique ou lipoprotéique, mais qui n'est pas constitué d'ARN car l'extraction de cet ARN n'affecte pas l'affinité pour l'argent. Ce composant renfermerait de l'histidine ou des histones, du fait que l'argent se fixe électivement sur le noyau imidazol (PETERS, 1955).

- Cytochimie

= Réaction de FEULGEN

Classiquement, le nucléole vrai était considéré comme totalement dépourvu d'ADN. Cependant, de nombreuses observations sont venues infirmer ces premières données, en montrant qu'en plus de la chromatine nucléolo-associée périphérique, le nucléole renferme des structures FEULGEN-positives (VINCENT, 1955; PULNARD, 1956; FURIERI, 1957; SWIFT, 1959; LETTRE et SIEBS, 1960, 1961; O'DONNEL, 1961).

La mise en évidence de filaments FEULGEN-positifs nécessite une fixation rigoureuse après prétraitement par l'adénosine.

= Coloration de UNNA-BRACHET

Le nucléole vrai se colore en rouge par la pyronine, alors que la chromatine nucléolo-associée prend le vert

---

(*) RITCHIE (1969) a pu retrouver un nucleolonema et une pars amorpha entourés d'une coque de chromatine nucléolo-associée grâce à une technique utilisant des anticorps fluorescents.

de méthyle. LETTRE et SIEBS (1960, 1961) quant à eux, observent que les nucléoles de fibroblastes en culture fixent le vert de méthyle.

= Coloration au bleu de toluidine

. L'utilisation de la méthode au bleu de toluidine molybdique (LOVE et LILES, 1959) révèle la présence d'au moins deux types de ribonucléoprotéines (RNP) intranucléolaires (LOVE et WALSH, 1963). Un type est coloré métachromatiquement par les variantes A et B de la méthode et consiste en de petites sphérules auxquelles on donne classiquement le nom de nucléolins (LOVE et BHARADWAJ, 1959). Le deuxième type est coloré métachromatiquement par la variante C.

. La coloration au bleu de toluidine après hydrolyse préalable par l'acide chlorhydrique 1N, permet de mettre en évidence des septum issus de la chromatine nucléolo-associée et pénétrant dans le corps nucléolaire (SMETANA et BUSCH, 1964; DESJARDINS et coll., 1966).

STRUCTURE FINE

Nucléoles in situ

- Nucléole vrai

Les premières microphotographies électroniques de nucléoles montraient que la structure complexe de ces derniers était filamenteuse (BORYSKO et BANG, 1951; BERNHARD, HAGUENAU et OBERLING, 1951). Les nucléoles ont le plus souvent un aspect pelotonné dans les coupes relativement épaisses (0,1 à 0,2 µ) et réticulaire dans les coupes très fines (BERNHARD et coll., 1955). Le diamètre du filament qui constitue ce réseau est de 450 à 2 000 Å. Ce filament serait continu; dans

les mailles du réseau existerait une matrice homogène, inconstante. Le filament, à plus forte résolution, parait constitué de grains (de 100 à 150 Å de diamètre), accolés les uns aux autres pour former de courts bâtonnets. Les auteurs notent la ressemblance de ces grains avec les ribosomes. Ils rapprochent leurs résultats de ceux d'ESTABLE et SOTELO et assimilent filament nucléolaire (de la Microscopie Electronique) au nucleolomena (de la Microscopie Optique), matrice homogène et pars amorpha.

Après utilisation d'une technique d'imprégnation argentique en Microscopie Electronique, IZARD et BERNHARD (1962), étudiant des cellules ganglionnaires, pancréatiques et des thymocytes n'observent pas d'alignement continu de grains d'argent à l'intérieur du nucléole; ils arrivent à la conclusion qu'il n'existe pas de filament continu mais un réseau qu'ils persistent à appeler nucleolonema, bien que les deux définitions ne concordent pas.

PAVALETZ et coll. (1967) à leur tour affirment l'existence d'un nucleolonema; ils le considèrent comme une structure complexe, imprégnée ça et là par l'argent et qui donne l'impression d'un filament présentant un dépôt continu d'argent.

En résumé, si l'on convient de conserver le terme nucleolonema pour désigner le réseau nucléolaire observé après les techniques de routine en Microscopie Electronique, il faut savoir que le nucleolonema argyrophile (selon ESTABLE et SOTELO) n'en représente qu'une partie, partie renfermant vraisemblablement un fort pourcentage d'histidine ou d'histone.

Le réseau nucléolaire est composé: d'une part, de grains de RNP, comparables par leur taille, leur densité et leur extraction par l'ARNase, aux ribosomes cytoplasmiques; d'autre part, d'éléments plus petits et plus nombreux, de nature protéique, digérés par la pepsine (MARINOZZI, 1962).

Dans la cellule pancréatique, les grains de RNP sont disposés en périphérie du réseau nucléolaire, contre la chromatine nucléolo-associée et, à l'intérieur du nucléole, en bordure des mailles du réseau (MARINOZZI, 1961, 1962).

L'utilisation des techniques de cytochimie ultrastructurale (MARINOZZI, 1963; MARINOZZI et BERNHARD, 1963), a permis de décrire trois composants essentiels dans le nucléole et ceci quelle que soit sa morphologie apparente:

= des granules, d'un diamètre moyen de 150 à 200 Å, qui réagissent de la même manière que les ribosomes cytoplasmiques vis à vis des colorations et de la digestion par l'ARNase;

= une matrice compacte, pouvant être extraite par la pepsine comme une protéine acide, constituant un réseau qui correspondrait au nucleolonema;

= des filaments, d'une épaisseur de 50 à 100 Å environ et d'une longueur de quelques centaines d'Å, qui sont enrobés dans la matrice protéique. Ces filaments se distinguent plus nettement sur les coupes digérées à la pepsine et disparaissent après digestion à l'ARNase.

En fait, si les différents auteurs sont d'accord pour affirmer que les granules renferment de l'ARN, la nature chimique des fibrilles demeure controversée. Comme le traitement par la pepsine, suivi d'une digestion par l'ARNase, fait disparaître granules et fibrilles alors que l'ADNase est sans action sur elles, il est vraisemblable que granules et fibrilles soient constitués de RNP. Mais selon ALDRIDGE et WATSON (1963), si le nucleolonema est bien formé de RNP, la pars amorpha n'est pas faite de protéines mais de désoxyribonucléoprotéines (DNP). Les composants particulaires du nucléole seraient disposés au contact des filaments de DNP de la pars amorpha.

- Chromatine nucléolo-associée

La chromatine nucléolo-associée (BERNHARD, 1965, 1966) constitue un mur discontinu de nucléohistones tout autour du corps nucléolaire et semble en continuité avec la chromatine marginale. Ces nucléohistones seraient composées de fibrilles hélicoïdales (de 200 à 300 Å de diamètre). La quantité de chromatine nucléolo-associée est extrêmement élevée dans les cellules glandulaires : dans les cellules pancréatiques, la chromatine nucléolo-associée est épaisse alors que dans les cellules hépatiques, elle forme une mince coque présentant de grandes interruptions.

Par ailleurs, on a pu prouver, au moyen de techniques couplées d'autohistoradiographie et de cytochimie ultrastructurale (GRANBOULAN et GRANBOULAN, 1963, 1964), l'existence de travées de chromatine intranucléolaire en continuité avec la chromatine nucléolo-associée. Après action de la pronase (MONNERON, 1966), cette chromatine intranucléolaire est particulièrement évidente. Après action de l'ARNase, son contraste est accru (YOTSUYANAGI, 1960, 1965; MONNERON, 1961; MENTRE, 1966, 1968). Après action de la pronase, suivie de celle de l'ARNase, il persiste un matériel peu dense, constitué de fibrilles très ténues.

La chromatine intranucléolaire occupe 4,1 à 7,2% de la surface nucléolaire sur les coupes (UNUMA, SMETANA et BUSCH, 1967).

Les fibrilles de chromatine intranucléolaire ont une épaisseur de 40 à 100 Å. A très fort grossissement (plus de 150 000), on observe des filaments "primaires" dans la matrice nucléolaire. Ces filaments simples, non enroulés, de 20 à 30 Å d'épaisseur ont la même densité que les fibrilles de chromatine; mais leur densité plus élevée permet de les distinguer des autres fibrilles de la matrice nucléolaire (UNUMA et coll., 1966). Ces filaments représenteraient des complexes de DNH.

SMETANA et coll. (1968) utilisant les digestions combinées : ARNase suivie d'une digestion partielle à la pepsine; pepsine suivie d'ADNase, ont pu confirmer la présence de travées chromatiniennes faites de fibrilles épaisses, et de filaments élémentaires de DNH constituant un réseau.

Au total, le nucléole apparaît comme un réseau tridimensionnel de filaments élémentaires de DNH donnant une formation plus ou moins sphérique, entourée d'une coque formée de fibrilles (faites de 4 à 6 filaments élémentaires) et cloisonnée par des travées composées des mêmes fibrilles.

Les formations décrites sous le nom de centres fibrillaires (RECHER et coll., 1969) seraient également constituées de DNP.

Nucléoles isolés

La structure fine des nucléoles isolés est généralement identique à celle des nucléoles in situ (MURAMATSU et coll., 1963; DESJARDINS et coll., 1963, 1965, 1966). La comparaison des techniques de sonication et de compression -décompression fait apparaître que cette dernière fournit des nucléoles compacts et préserve mieux la chromatine nucléolo-associée.

Il est possible également de pratiquer les techniques de cytochimie ultrastructurale sur les nucléoles isolés. On a pu montrer ainsi que les fibrilles de RNP (de 100 à 160 Å d'épaisseur) étaient constituées de fibrilles hélicoïdales plus minces (de 40 à 60 Å d'épaisseur), qui se résolvent finalement en filaments très contournés (de 15 à 30 Å d'épaisseur).

En définitive, il semble que l'organisation moléculaire du nucléole, tant in situ qu'in vitro, doit être conçue de la façon suivante :

1) La structure de base est constituée d'un réseau

tridimensionnel d'ADN ou de DNH, fait de filaments élémentaires (de 20 Å d'épaisseur en moyenne). Ce réseau aurait été mis en évidence par ESTABLE et SOTELO, sous le nom de nucleolonema, par dépôt discontinu d'argent sur les histones liées à l'ADN. A côté des filaments élémentaires, existeraient des fibrilles (de 80 à 100 Å d'épaisseur) résultant probablement de l'accolement latéral des chaînes d'ADN. Ces fibrilles existent à l'état libre, ou entrent dans la constitution des travées intranucléolaires et de la chromatine périnucléolaire.

2) Une matrice protéique comble les lacunes de ce réseau. Elle est généralement amorphe (pars amorpha), mais elle renferme des fibrilles protéiques associées aux filaments d'ADN.

3) Des RNP de forme granulaire (de 150 Å en moyenne) ou fibrillaire (de 40 à 60 Å d'épaisseur, elles mêmes faites de filaments de 15 à 30 Å d'épaisseur), dont les proportions relatives ainsi que la répartition sont variables. Elles dessinent, dans les cas typiques, un réseau (nucleolonema de la Microscopie Electronique) superposé au réticulum d'ADN qui est alors masqué.

4) Les divers constituants : nucléolins, zônes claires, vacuoles, centres fibrillaires sont des formations contingentes en rapport avec une activité métabolique particulière.

VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES

Variations de forme

La forme du nucléole varie avec le cycle cellulaire (GONZALES et MARDONE, 1968). Les variations de forme s'accompagnent de variations topographiques : en général, les nucléoles arrondis ou ovalaires se trouvent au centre du noyau; les nucléoles irréguliers en périphérie, plus ou moins près

de la membrane nucléaire.

Lorsqu'il y a plusieurs nucléoles, l'irrégularité de forme est due à des élongations de la pars amorpha, destinées à unir les nucléoles qui sont adhérents par leur périphérie (MIRONESCU et DRAGOMIR, 1966).

Variations de volume

Des deux variations possibles : hypertrophie et hypotrophie, la première est de beaucoup la plus fréquente.

L'hypertrophie nucléolaire s'observe :

- dans les tissus à croissance rapide;
- par suite de carence en certains acides aminés essentiels, ou en protéines (STENRAM, 1956, 1958, chez le Rat);
- par suite de l'augmentation du degré de ploïdie; mais cette hypertrophie serait due à une fusion nucléolaire consécutive à une augmentation du nombre des nucléoles (NADAL, 1967).

L'hypotrophie nucléolaire, plus rare, s'observe chez les animaux soumis à un régime riche en caséine (STENRAM, 1958) ou après hypophysectomie (NADAL et ZAJDELA, 1967).

Variations de nombre

Le nombre de nucléoles varie avec le nombre de SAT-chromosomes (OHNO et coll., 1961; HARNDEN, 1961; FERGUSSON - SMITH et HANDMAKER, 1961). Le nombre de nucléoles serait plus élevé chez la Femme et ceci serait corroboré par le fait que les cellules possédant un corpuscule de BARR, possédent plus de nucléoles que les cellules qui en sont dépourvues (SACHS et DANON, 1956; PETERSEN et THERKELSEN, 1962). Le nombre de nucléoles augmente avec l'activité mitotique (MIRONESCU et DRAGOMIR, 1966). Les mécanismes des variations du nombre de nucléoles demeurent discutés.

Variations de structure

Les variations de structure nucléolaire sont en fait en rapport avec le cycle cellulaire (GONZALES et NARDONE, 1968).

En conclusion, on retiendra que sur le plan morphologique, le nucléole représente une structure à double composante : ribonucléoprotéique et désoxyribonucléoprotéique, dont la forme, le volume, le nombre et la structure sont variables avec l'activité métabolique.

*

* *

*

* *

-=- D O N N E E S B I O C H I M I Q U E S -=-

* *

*

P L A N

Composition Chimique

1) ADN

2) ARN

- Composition en bases
- Constantes de sédimentation
- Caractères biologiques
- Identification aux composants morphologiques

3) Protéines

4) Lipides

5) Autres constituants

Equipement Enzymatique

Composition Chimique

De nombreux travaux ont permis d'établir depuis longtemps que les nucléoles renfermaient essentiellement des acides nucléiques : ARN et ADN (ALBUQUERQUE et SERRA, 1951) et des protéines (VINCENT, 1955; SIRLIN, 1962; BUSCH et coll., 1963). On a rapporté également la présence de phospholipides, de mucopolysaccharides, d'oligo-éléments (STERN et coll., 1959; SIRLIN, 1962; REES et coll., 1962).

Cependant des estimations quantitatives précises n'ont pu être obtenues que plus tardivement (CASPERSSON et SCHULTZ, 1940, NUREMBERG et coll., 1952; VINCENT, 1952; BALTUS, 1954; MONTY et coll., 1956; STENRAM, 1958, 1961).

Les études récentes permettent d'établir comme suit la composition chimique des nucléoles de foie isolés (MARAMATSU et BUSCH, 1967) :

Animal		ARN	ADN	ARN/ADN	Protéines
Rat	Foie normal	8,4	6,1	1,4	85,5
	Foie en régénération (6h)	7,6	4,6	1,7	87,8
	Foie en régénération (18h)	15,5	5,4	2,9	79,1
Cobaye		4,1	9,5	0,43	86,4

Nous examinerons chacun de ces divers constituants nucléolaires en relevant les données caractéristiques.

1) ADN

On constate sur le tableau ci-dessus la forte teneur en ADN trouvée dans les nucléoles isolés. Si des taux allant jusqu'à 16-19% ont été publiés, le taux d'ADN est en général plus faible : de 3 à 10 %. Ceci est corroboré par les observations en Microscopie Electronique. Pour certains auteurs, les pourcentages élevés d'ADN observés après isolement des nucléoles seraient dûs à une contamination par de la chromatine extranucléolaire.

La composition en bases (*) de l'ADN obtenu à partir des nucléoles isolés n'est pas différente de celle de l'ADN nucléaire total (DESJARDINS et coll., 1966; BUSCH et coll., 1963; MAC LEISH, 1968).

2) ARN

Les taux d'ARN notés par les différents auteurs sont variables. On retiendra une valeur moyenne de 5 à 15% du poids sec.

- Composition en bases

L'ARN nucléolaire est riche en guanine et en cytosine (**) (VINCENT, 1952) et sa composition en bases est très proche de celle de l'ARN ribosomal (VINCENT, 1952; EDSTROM, 1960, EDSTROM et coll., 1961); cependant il est difficile d'établir une comparaison avec l'ARN ribosomal, car celui-ci comporte 2 fractions (28 S et 18 S) dont la composition en bases est différente (MURAMATSU et coll., 1966; SHERRER et coll., 1963; MONTAGNIER et BELLAMY, 1964).

L'ARN des nucléoles isolés est riche en guanine et pauvre en cytosine; sa composition en bases est très proche de celle de l'ARN ribosomal 28 S mais non de l'ARN 18 S (MAGGIO et coll., 1963). Il est probable que l'ARN nucléolaire soit le précuseur de l'ARN ribosomal 28 S (MURAMATSU et coll., 1966).

Les expériences d'hybridation ont montré l'existence de segments du génome spécifiques de l'ARN ribosomal dans

---

(*) Les bases nucléotidiques de l'ADN sont :

- l'adénine (A) et la guanine (G) (bases puriques) ;
- la thymine (T) et la cytosine (C) (bases pyrimidiques).

(**) Les 4 bases de l'ARN sont les suivantes :

- Adénine et guanine
- Uracile (U) et cytosine (bases pyrimidiques).

l'ADN nucléolaire (MAC CONKEY et HOPKINS, 1964). Il a été définitivement prouvé que les cistrons codant pour l'ARN 18 S et 28 S sont localisés dans la région de l'organisateur nucléolaire et que ces cistrons ont une position alternée (BROWN et GURDON, 1964; YANKOFSKY et SPIEGELMAN, 1962, 1963; RITOSSA et SPIEGELMAN, 1965; QUAGLIAROTTI et RITOSSA, 1968).

- Constantes de sédimentation (*)

Du point de vue de leurs constantes de sédimentation, les ARN nucléolaires peuvent être divisés en plusieurs catégories : 3 fractions principales 28 S, 17 S et 5 S; et une faible quantité de composants plus lourds entre 35 et 40 S (BIRNSTIEL et coll., 1963; CHIPCHASE et BIRNSTIEL, 1963). Pour certains auteurs, il existerait 2 fractions lourdes, 35 S et 45 S en quantités non négligeables (STEELE, 1965; MURAMATSU et BUSCH, 1965). Cependant, il est difficile d'affirmer que l'ARN n'a pas été dégradé au cours de l'extraction.

Par l'étude de la cinétique du marquage (au moyen d'acide orotique marqué suivi de l'isolement des nucléoles), on peut montrer que l'ARN 45 S est synthétisé dans le nucléole et que la séquence 45 S ⟶ 35 S ⟶ 28 S se déroule à l'intérieur du nucléole. L'origine de l'ARN 18 S n'est pas clairement élucidée.

Par ailleurs, l'hypertrophie nucléolaire s'accompagne volontiers d'une forte élévation des taux d'ARN 45 S et 35 S.

- Caractères biologiques

S'il est généralement admis que l'ARN ribosomal a pour précurseur l'ARN nucléolaire, le problème de la présence dans le nucléole d'ARN messager et d'ARN de transfert (ou ARN soluble) demeure débattu.

(*) Les constantes de sédimentation s'expriment en unités SVEDBERG (S).

L'ARN messager proviendrait pour une grande partie du nucléole où il serait représenté par une fraction 45 S (MURAMATSU et coll., 1966). Pour certains auteurs, le nucléole ne fait que modifier l'ARN messager synthétisé par la chromatine extra-nucléolaire (SIRLIN, 1960).

Un certain nombre d'auteurs ont admis que le nucléole synthétise l'ARN de transfert. D'autres pensent que l'ARN de transfert pourrait échanger son extrémité -CCA dans le nucléole (VINCENT et BALTUS, 1959) ou bien y incorporer des bases méthylées (BIRNSTIEL et coll., 1963; SIRLIN et coll., 1963). Cependant, les bases méthylées, non spécifiques de l'ARN de transfert, caractériseraient plutôt l'ARN ribosomal (MURAMATSU et coll., 1967). Quoiqu'il en soit, on a pu prouver que l'ARN 4 S (qui représente très probablement l'ARN de transfert) n'est pas synthétisé dans le nucléole (WOODS et ZUBAY, 1966).

- Identification aux composants morphologiques

L'identification des différentes fractions d'ARN aux composants morphologiques du nucléole est capitale pour l'interprétation des lésions nucléolaires. Diverses observations (NARAYAN S., STEEL et BUSCH, 1966) conduisent à penser que l'ARN 6 S se trouve dans les éléments fibrillaires et l'ARN 28 S dans les éléments granulaires.

3) Protéines

Les protéines représentent 70 à 85% du poids sec du nucléole.

Les méthodes histochimiques ont révélé depuis longtemps la présence dans le nucléole :

- de protéines basiques (CASPERSSON et SCHULTZ, 1940; CASPERSSON, 1950; SERRA et QUERIOZ, 1944; HORN et WARD, 1957; BLOCH et HEN, 1960; MENZIES, 1962);
- de protéines acides (CASPERSSON et SCHULTZ, 1940);

- de protéines riches en groupements sulfhydrilles (-SH) (SANDRITTER et KRYGIER, 1959; ALBERTINI, 1959; ZAGURY, 1957).

Cependant les quantités relatives de ces diverses protéines et leur rôle respectif demeurent obscurs. (*)

Les protéines nucléolaires résiduelles sont analogues aux protéines ribosomales, ce qui confirme l'idée que le nucléole renferme des protéines ribosomales (BIRNSTIEL et coll., 1963; BIRNSTIEL et HYDE, 1963).

4) Lipides

Les travaux anciens (ALBUQUERQUE et SERRA, 1951) ont établi que les lipides, et spécialement les phospholipides, sont des constituants normaux des nucléoles depuis la télophase jusqu'à la fin de la prophase.

En fait, il semble, comme le montrent les observations en Microscopie Electronique, que la présence de lipides est due simplement à une sorte de "pinocytose" s'effectuant au niveau de la membrane nucléaire (THOENES, 1964).

5) Autres constituants

On a rapporté également la présence de mucopolysaccharides et d'oligo-éléments divers mais ces observations sont à considérer avec une grande prudence, étant donné l'absence de données biochimiques détaillées portant sur les nucléoles isolés (REES et coll., 1962; STERN et coll., 1959).

(*) Dans un travail récent, GROGAN et coll. (1967) isolent des nucléoles de foie de Rat sur une grande échelle, ce qui permet une analyse plus précise des protéines. Ces auteurs distinguent 3 fractions protéiques :

- protéines solubles dans les solutions salines (30%)
- protéines solubles dans les solutions acides (30%)
- protéines résiduelles (40%).

Equipement enzymatique

Grâce aux techniques histochimiques, on a pu localiser au nucléole in situ les activités enzymatiques suivantes :

- phosphatase acide (MULNARD, 1955; VORBRODT, 1958)
- phosphatase alcaline (MULNARD, 1955; ZAJDELA et MORIN, 1952; ZALOKAR, 1960; GOLARZ et BOURNE, 1961)
- ATPase (LANDSCHUTZ, 1950; DALCQ, 1959)
- 5' Nucléotidase (VORBRODT, 1958)
- Déshydrogénase succinique (DE et coll., 1961).

Cependant, sur les nucléoles isolés, d'autres enzymes ont pu être déceléss (*) :

- Nucléoside phosphorylase (BALTUS, 1954)
- DPN - synthétase (BALTUS, 1954)
- ARNase (BALTUS, 1962)
- Enzymes glycolytiques solubles (succino-déshydrogénase) à un taux faible.

Parmi les enzymes nucléaires, certaines existent à l'état concentré dans le nucléole (**):

- ARN-polymérase (RO et coll., 1964; TSUKADA et LIEBERMAN, 1964; LIAU et coll., 1965)
- ARNase (BALTUS, 1954, 1962; VILLALOBOS, 1964, 1965)
- DPN pyrophosphorylase (SIRLIN, 1962)
- ATPase A.

Les ADNase I et II, l'ATPase B ne sont pas concentrées dans le nucléole. Le nucléole offre en outre une activité polynucléotide-phosphorylase; la présence de cette enzyme se justifie par le fait que l'ARN nucléaire est dégradé dans la nucléole (HARRIS, 1959, 1963, 1964) ou alors par le fait

---

(*) Ces études ont porté sur l'Etoile de mer.

(**) En effet, ces enzymes sont, respectivement, 24, 6, 3 et 2 fois plus concentrées dans le nucléole que dans le noyau.

que cette enzyme possède un rôle synthétique (SIEBERT et coll., 1966).

Ainsi l'on constate - bien que les résultats diffèrent avec les auteurs et les techniques utilisées - combien est riche l'équipement enzymatique du nucléole, ce qui en fait un véritable centre de commande du métabolisme nucléaire.

*

* *

*

* *

-=- D O N N E E S B I O L O G I Q U E S -=-

* *

*

P L A N

EVOLUTION CYCLIQUE DU NUCLEOLE

Rappel morphologique du noyau

- Aspect du noyau interphasique
  - = Microscopie Optique
  - = Microscopie Electronique
- Aspect du noyau au cours de la mitose
  - = Structure du chromosome
  - = Chromosome nucléolaire et organisateur nucléolaire
- Cycle du noyau

Le cycle nucléolaire

Régulation nucléolaire

PHYSIOLOGIE DU NUCLEOLE

La protéosynthèse et le code génétique

Rôles du nucléole

CYTOPATHOLOGIE EXPERIMENTALE DU NUCLEOLE

Rôle des agents physiques

- Chaleur
- Radiations

Rôle des agents chimiques

- Anti-métabolites
- Divers

La biologie du nucléole ne peut-être comprise qu'en mettant en évidence les relations morphologiques et fonctionnelles entre le nucléole et les autres constituants du noyau. Ces relations, cependant, sont variables, non seulement en fonction de l'activité métabolique mais surtout en fonction du cycle mitotique auquel il convient de faire correspondre un cycle nucléolaire.

Nous allons tout d'abord examiner l'aspect du noyau interphasique et au cours de la division cellulaire pour envisager l'évolution cyclique du nucléole. Ceci nous permettra de mettre en évidence les facteurs susceptibles d'intervenir dans la régulation nucléolaire. Nous aborderons ensuite la physiologie nucléolaire proprement dite.

EVOLUTION CYCLIQUE DU NUCLEOLE

Rappel morphologique du noyau

- Aspect du noyau interphasique

= Microscopie Optique

Après fixation et coloration, le noyau apparaît entouré d'une membrane nucléaire (représentée par une mince ligne continue) qui limite le nucléoplasme ou suc nucléaire, non colorable; celui-ci renferme un réseau aux points nodaux duquel siègent des corpuscules, généralement basophiles, de nombre et de taille variables, correspondant aux amas de chromatine : ce sont les caryosomes.

Au niveau des cellules somatiques, il existe, dans le sexe femelle, une petite masse chromatinienne ayant une topographie variable d'une espèce à l'autre : la chromatine sexuelle (BARR et BERTRAM, 1949; BARR et coll., 1950; GRAHAM et BARR, 1952; GRAHAM, 1952). Chez la Femme, le corpuscule chromatinien ou corpuscule de BARR apparaît comme une masse plan-convexe appliquée contre la membrane nucléaire, de 1 µ de diamètre en moyenne (0,7 à 1,2 µ); parfois, il est triangu-

laire, ou représenté par un simple épaississement de la membrane nucléaire. Le corpuscule de BARR correspond à l'X hétéropycnotique c'est à dire à l'X génétiquement inactif.

Cette chromatine sexuelle offre souvent des rapports étroits de contiguité, voire même de contuinuité avec le nucléole.

= Microscopie Electronique

. Caryoplasme (*)

Le caryoplasme offre à considérer, en Microscopie Electronique, 3 sortes de constituants : la chromatine, considérée comme la forme interphasique des chromosomes; des structures renfermant ou transportant des RNP; et des inclusions diverses dont la signification demeure discutée.

+ Chromatine

La structure fine de la chromatine a longtemps été mal connue en raison des difficultés techniques (WISCHNITZER, 1960; MONNERON et BERNHARD, 1969). La chromatine consisterait essentiellement en fibrilles de 80 Å d'épaisseur (GEORGIEV et CHENTSOV, 1962) correspondant aux macromolécules de DNP (BOPP, HASSEN et KAMP, 1959). Celles-ci paraissent punctiformes en coupe transversale.

Cependant, à l'échelle ultrastructurale, on retrouve également la distinction entre hétérochromatine et euchromatine. Les macromolécules de DNP s'agencent en filaments élémentaires de 30 à 60 Å de diamètre ou "chromonemata primaires"; des paires de ces chromonemata peuvent s'agencer en doubles hélices pour constituer des fibrilles plus épaisses, de 300 à 500 Å de diamètre, ou "chromonemata secondaires" (GRUNDMANN, 1964). Cette différence d'organisation serait

---

(*) GRUNDMANN (1964) désigne sous le nom de caryoplasme "la substance située à l'intérieur de l'enveloppe nucléaire et en dehors du nucléole".

responsable de l'existence de 2 types morphologiquement distincts :

l'hétérochromatine, plus ou moins granuleuse, dense, située en périphérie du noyau, et ménageant des passages libres devant les pores nucléaires (BERNHARD et GRANBOULAN, 1963; SWIFT, 1963; HAY et REVEL, 1963).

l'euchromatine, peu dense, fibrillaire.

+ Particules ribonucléoprotéiques

Ces particules sont de plusieurs types :

1) Ribosomes nucléaires

De nombreux auteurs ont décrit des granules (de 150 à 200 Å de diamètre) considérés comme des ribosomes nucléaires (DAVIS et MITCHELL, 1960; FRENSTER et coll., 1961; WANG, 1961; MARINOZZI, 1962; SWIFT, 1962, 1963; MAGGIO et coll., 1963; ALLFREY, 1963; NAORA, 1966; LAWFORD et coll., 1967; SADOWSKI et HOWDEN, 1968). Cependant, sur le plan morphologique, des particules analogues à celles isolées du cytoplasme n'existent pas dans le caryoplasme (MONNERON et BERNHARD, 1969).

2) Granules interchromatiniens

Il s'agit d'amas de particules (de 200 à 250 Å de diamètre environ), très denses, disposées dans les zônes interchromatiniennes (SWIFT, 1959; GRANBOULAN et BERNHARD, 1961; RIS, 1962; MONNERON et BERNHARD, 1969). Ces granules sont en rapport avec une variété de RNP dont l'ARN est particulièrement protégé (MONNERON et MOULE, 1968; SWIFT, 1962, 1963; WATSON et ALDRIDGE, 1961; WATSON, 1964). Ils correspondent probablement aux particules 40 S isolées.

3) Granules périchromatiniens

Ce sont des particules très denses (de 400 à 450 Å de diamètre) généralement entourées d'un halo clair (de 250 Å d'épaisseur), disposées à la périphérie des mottes chromatiniennes et au niveau des passages conduisant aux pores nucléaires. Leur nombre est de 500 à 2 000 par noyau (WATSON, 1962, 1964;

MONNERON et BERNHARD, 1969) (*).

4) Fibrilles périchromatiniennes (MONNERON et BERNHARD, 1969)

Ces fibrilles (de 30 à 50 Å, voire même de 200 Å de diamètre) se présentent sous forme d'anneaux entourant certaines mottes chromatiniennes (**). Elles semblent parfois reliées aux granules interchromatiniens.

5) Corpuscules hélicoïdaux (MONNERON et BERNHARD, 1969)

Ce sont des structures (de 0,3 à 0,5 µ de diamètre) composées de fibrilles (de 400 à 600 Å) elles-mêmes constituées de filaments contournés (de 50 Å d'épaisseur) dont on n'observe qu'un exemplaire par noyau.

En définitive, il semble bien qu'à la diversité des ARN sur le plan fonctionnel (ARN ribosomal, ARN de transfert, ARN messager) corresponde une diversité morphologique des structures renfermant de l'ARN (MONNERON et BERNHARD, 1969).

+ Inclusions nucléaires

De très nombreux travaux ont été consacrés aux inclusions nucléaires (BOUTEILLE et coll., 1966, 1967; KRISHAN et coll., 1967; YASUZUMI et coll., 1968; POPOFF et STEWART, 1968; BEAULATON, 1968; DUPUY - COIN et coll., 1969;

(*) Les granules périchromatiniens représentent sans doute l'ARN messager (ALLFREY et coll., 1966; LITTAU et coll., 1964; POGGO et coll., 1968; MONNERON, 1969; MONNERON et BERNHARD, 1969).

(**) Les fibrilles périchromatiniennes, constituées des diverses variétés d'ARN (DARNELL, 1968; PENMAN et coll., 1968; SOERO et coll., 1968; WARNER, 1966), représenteraient l'expression morphologique de la transcription le long des nucléohistones (GALL et CALLAN, 1962; ALLFREY et coll., 1966; MONNERON, 1969).

HENRY et PETTS, 1969; KIERSZENBAUM, 1969; SEITE, 1970). Les plus fréquentes sont les corps nucléaires. (*)

. Membrane nucléaire

L'enveloppe nucléaire est formée de 2 feuillets denses (épais chacun de 80 à 100 Å), séparés par un espace (large de 200 à 300 Å), appelé espace périnucléaire (WATSON, 1965). Chacun de ces feuillets présente, à haute résolution, l'aspect tristratifié habituel des cytomembranes.

La membrane nucléaire se caractérise par la présence de très nombreux "pores", répartis d'une façon régulière, généralement arrondis, de quelques centaines d'angströms de diamètre (au minimum de 300 à 400 Å selon AFZELIUS, 1955; au maximum 1 000 Å selon WATSON, 1959). En fait, la structure fine du pore est très complexe et un nombre considérable de travaux lui a été consacré.(**)

- Aspect du noyau au cours de la mitose

Au cours de la mitose, le noyau est caractérisé par la présence des chromosomes, dont la structure est particulièrement nette à la métaphase et à l'anaphase.

(*) Selon BOUTELLE et coll. (1968) et SEITE (1970), leur présence est liée, très généralement, à un état d'hyperactivité cellulaire quel qu'en soit le déterminisme (physiologique, hormonal, pharmacodynamique, viral ou tumoral).

(**) Le pore comporte 3 parties : la couronne (anneau en coupe tangentielle); le diaphragme et l'élément central. La couronne est placée au niveau de la soudure des feuillets interne et externe de l'enveloppe nucléaire. Le diaphragme semble constitué de structures rayonnantes qui relient l'élément central à la couronne (WEIER, 1967).

= Structure du chromosome

. Les chromosomes métaphasiques apparaissent comme des bâtonnets cylindriques de taille variable. Dans l'espèce humaine, leur longueur est de 4 à 9 µ et leur largeur de 0,1 à 1 µ.

Les chromosomes offrent à étudier :

+ une constriction primaire : zône étroite, achromatique, claire, contenant un granule de quelques microns de diamètre; le centromère ou kinétochore (DARLINGTON, 1963). Les segments situés de part et d'autre du centromère sont les bras chromosomiques.

+ parfois une ou plusieurs constrictions secondaires, d'étendue variable, de topographie bien précise et sans corpuscule.

+ 2 (parfois 4) filaments longitudinaux, basophiles, FEULGEN positifs, particulièrement nets dès la prophase : ce sont les chromonema (VEJDOVSKY, 1912). Chaque filament (de 0,3 à 0,5 µ de diamètre) présente un enroulement de base très serré ou spiralisation mineure auquel se superpose une spiralisation majeure. La spiralisation chromonematique est plus dense et plus stable dans les segments hétérochromatiques que dans les zônes euchromatiques des chromosomes. Elle est absente au niveau des constrictions.

+ des épaississements en forme de granules, très colorables, qui sont répartis le long des chromonema selon une séquence bien déterminée; ce sont les chromomères. On admet que les chromomères représentent des zônes chromonematiques fortement spiralées (RIS, 1957).

+ une matrice chromosomique, constituée d'une substance amorphe, entourant les chromonema et affectant la même disposition spiralée.

. La structure fine du chromosome, particulement

élucidée, paraît être la suivante .

Les chromosomes examinés in situ sont composés de fibrilles ou sub-chromonema (de 100 à 150 Å de diamètre), eux-mêmes constitués de filaments ou protochromonema (de 25 à 50 Å d'épaisseur). Le chromonema résulterait de l'association paranémique de 2 sub-chromonema (MOSES, 1960; RIS, 1962). En fait, il semble que les fibrilles chromosomiques aient un diamètre variable (de 50 à 300 Å), en moyenne de 150 Å (BARNICOT, 1967).

Les chromosomes isolés ont également une structure multifibrillaire (RIS, 1966; DU PRAW, 1966; WOLFE, 1965; WOLFE et GRIM, 1967). La fibrille (de 250 Å en moyenne) comporte un sub-chromonema (de 100 Å d'épaisseur), entouré d'un matériel probablement de nature protéique qui constitue la matrice chromosomique.

L'organisation moléculaire du chromosome a été l'objet de vives controverses. Certains auteurs ont soutenu que le chromosome est composé d'une seule macromolécule de DNP (protéines de type histonique surtout) continue d'un bout à l'autre de l'organite, extrêmement plissée et offrant un enroulement "quaternaire" en ressort à boudin (SWIFT, 1962; GALL, 1963; TAYLOR, 1963, ZUBAY, 1964). Ce modèle, proposé pour le chromosome humain (DU PRAW, 1966), est très contesté.

Quoiqu'il en soit, il convient de retenir que l'unité élémentaire de structure est une fibrille (de 50 à 300 Å de diamètre) constituée de DNH. Cette fibrille élémentaire se retrouve également dans le noyau interphasique où elle présente une disposition spatiale différente.

La structure du chromosome étant ainsi présentée, quels sont les rapports du chromosome et du nucléole ? Ceci revient à considérer la structure de certains chromosomes particuliers appelés chromosomes nucléolaires.

= <u>Chromosome nucléolaire et organisateur nucléolaire</u>

Au niveau de certains chromosomes existe une cons-

triction secondaire spéciale : la constriction satellitaire, décrite également sous le nom d'organisateur nucléolaire ou zône nucléolaire ou encore SAT - zône (HEITZ, 1931; HEITZ et BAUER, 1933; MAC CLINTOCK, 1934; KAUFMAN, 1934, 1948; MATSUURA, 1938). Cette zône sépare le corps du chromosome d'un corpuscule chromatique arrondi ou allongé : le satellite ou trabant (NAWASHIN, 1912). Celui-ci est rattaché au corps chromosomique par un mince filament chromatinien connu sous le nom de filament satellitaire ou SAT-filament. Dans l'espèce humaine, les chromosomes satellitaires sont représentés par les chromosomes des paires 13, 14, 21 et probablement aussi par ceux des paires 15 et 22 (HAMERTON, 1961).

Les sites aptes à produire du matériel nucléolaire seraient diffus sur l'ensemble des chromosomes (GABRUSEWYCZ - GARCIA et KLEINFELD, 1966). Des structures semblables à l'organisateur nucléolaire peuvent exister à l'extrêmité du chromosome; elles correspondraient alors aux télomères.

La structure fine de l'organisateur nucléolaire est représentée par des enroulements de fibrilles (de 100 Å d'épaisseur). Cette zône est entourée par une formation discoïdale ayant même structure fine que le nucleolonema et la pars amorpha du nucléole vrai. Seules les fibrilles (de 100 Å) représentent l'organisateur nucléolaire (KALNINS et coll., 1964).

- Cycle du noyau

En fait, la distinction entre noyau interphasique et noyau mitotique est assez artificielle. Le noyau décrit, en effet, un véritable cycle, à la fois morphologique et fonctionnel.

Le degré de spiralisation chromonématique varie avec le stade de la division cellulaire. De la prophase à la métaphase, les chromosomes sont dédoublés et comportent deux chromatides (MAC CLUNG, 1900) sinueuses, accolées au niveau du centromère; chaque chromatide renfermant 2 chromonema. Ces derniers se dédoublent à la fin de l'interphase ou au début de

la prophase. A la fin de la prophase commence la spiralisation des chromonema qui devient maximum à l'anaphase. Au cours de l'anaphase et de la télophase, la spiralisation se relâche.

Ces modifications morphologiques doivent être considérées en fonction du cycle de génération cellulaire (STANNERS et TILL, 1960; DEFENDI et MANSON, 1963). Les dosages cytophotométriques et la méthode autohistoradiographique ont permis d'établir que ce cycle comporte 4 phases :

= la phase G1 ou phase de présynthèse; elle succède immédiatement à la télophase; c'est une période de repos intercinétique, proprement dit.
= la phase S ou période de synthèse de l'ADN et des histones.
= la phase G2 ou phase de post-synthèse; elle précède la division cellulaire; à ce stade, le noyau est tétraploïde.
= la phase M ou période mitotique proprement dite.

A ce cycle du noyau, il convient de faire correspondre un cycle nucléolaire.

Le cycle nucléolaire

CARLETON (1920) puis VAN CAMP (1924) avaient déjà entrevu la possibilité d'un cycle nucléolaire. En effet, dans certaines cellules végétales, ces auteurs avaient pu suivre l'évolution du nucléole au cours de la division cellulaire.

Cependant, la notion d'un cycle nucléolaire résulte de travaux plus récents (LIN, 1955; LOVE, 1957; LA FONTAINE, 1958; LA COUR et CHAYEN, 1958; BOLOGNARI, 1959; LA FONTAINE et CHOUINARD, 1961, 1963; STEVENS, 1961; OLAH, 1962; DAS, 1963; DAVIS, 1963 ...). Au début, on pensait que le nucléole, sécrété à la surface des chromosomes, s'en détachait à la télophase (RATTENBURY et SERRA, 1952), accomplissait ses fonctions au cours de l'interphase; ensuite, les restes nucléolaires se rac-

cordaient de nouveau aux chromosomes (VAN CAMP, 1924). Ces conceptions étaient malheureusement entachées de l'idée que la matière chromosomique disparaissait au cours de l'interphase.

Les premières observations micro-électroniques (LA FONTAINE, 1958) ont montré que ce sont les granules denses (de 150 Å) qui apparaissent d'abord entre les bras chromosomiques, à la fin de l'anaphase et au début de la télophase, où ils deviennent plus concentrés. Ces granules donnent des corpuscules prénucléolaires qui fusionnent à leur tour pour former les nucléoles mûrs interphasiques (*).

En fait, granules (de 150 Å) et fibrilles (de 50 Å) apparaissent simultanément (JACOB et SIRLIN, 1963; LA FONTAINE et CHOUINARD, 1963).

A la fin de la prophase, le nucléole disparaît. Cette disparition du nucléole serait due à l'arrêt de la synthèse de l'ARN (PRESCOTT et BENDER, 1962; ARIGHI, 1965). Cependant, pour HSU et coll.,(1965), le nucléole ne disparaît jamais au cours de la mitose. Le matériel résiduel servirait de réserve d'ARN, dont une partie au moins irait aux cellules-filles, pour permettre la protéosynthèse immédiatement après la division cellulaire.

En définitive, bien que les données soient fragmentaires, le cycle nucléolaire peut être conçu de la façon suivante :

- Au cours de l'interphase, les nucléoles augmentent de volume;

(*) Ces observations sont confirmées par DAS etALFERT (1959) qui font remarquer que tous les chromosomes produisent des corpuscules prénucléolaires lesquels fusionnent pour donner 1 à 3, rarement 4, nucléoles mûrs.

- A la prophase, commence l'involution nucléolaire; elle débute par la disparition de la matrice nucléolaire et par la fragmentation du constituant granulo-filamenteux (STEVENS, 1965);
- A la métaphase et sans doute aussi à l'anaphase, il persiste seulement des résidus nucléolaires (TANDLER, 1966) au contact des chromosomes;
- A la télophase, un nouveau nucléole commence à se former (constitution d'une substance argyrophile le long des chromosomes), en des sites autres que ceux de l'organisateur nucléolaire (TANDLER, 1966).

L'organisateur nucléolaire aurait essentiellement pour rôle de regrouper les corpuscules prénucléolaires en un ou plusieurs nucléoles mûrs; il intervient également dans l'organisation moléculaire du nucléole en lui donnant son architecture définitive. Puis le cycle recommence.

On a pu mettre en parallèle l'évolution cyclique du nucléole avec le cycle de génération cellulaire (GONZALES et NARDONE, 1968).

- Entre la phase G1 et la mitose, on note une réduction significative du nombre des nucléoles, réduction attribuée à une fusion nucléolaire. L'augmentation de taille concomittante résulte aussi bien de la fusion nucléolaire que d'une augmentation de l'activité synthétique intranucléolaire.
- Au cours des phases G1 et G2, le nucléole se caractérise par une forme irrégulière et une association plus marquée avec la membrane nucléaire.
- par contre, au cours de la phase S, les nucléoles sont ovalaires et se situent au centre du noyau.

Régulation nucléolaire

Les données envisagées ci-dessus permettent d'entre-

voir la régulation nucléolaire. Si divers facteurs peuvent influer sur la forme, le volume, le nombre et la structure des nucléoles, on ne connait pas le déterminisme exact de ces variations. On peut cependant admettre que le nombre de nucléoles est en rapport avec le nombre d'organisateurs nucléolaires. En dernière analyse, on retiendra que c'est la mise en jeu de tels ou tels groupes de gènes, en fonction de l'activité métabolique, qui est déterminante sur les nucléoles.

PHYSIOLOGIE DU NUCLEOLE

Avant d'envisager la signification et les rôles du nucléole, il convient d'examiner tout d'abord le mécanisme et la régulation de la protéosynthèse car c'est par ce biais que le nucléole remplit ces diverses fonctions.

La protéosynthèse et le code génétique

La protéosynthèse joue un rôle capital dans la cellule. En effet, "les propriétés, les structures, les activités qui caractérisent une cellule doivent, en définitive, être rapportées à la structure et à l'activité des protéines que cette cellule est capable de synthétiser" (JACOB et MONOD, 1964).

On admet actuellement que la configuration chimique de chaque enzyme, et, d'une façon générale de chaque variété protéinique est liée à un gène distinct (*).

(*) On a établi que le matériel héréditaire est constitué par l'ADN (AVERY, MAC LEOAD, MAC CARTHY, 1944; HERSHEY et CHASE, 1952; PERUTZ, 1962).

La structure de l'ADN est en double hélice (WATSON et CRICK, 1953).

L'ensemble des données connues jusqu'ici peut se résumer en céci : la synthèse des protéines, localisée au cytoplasme, est sous la dépendance de l'ARN (*). D'autre part, la spécificité de la protéine néoformée, la séquence et l'orientation spatiale de ses amino-acides sont commandés génétiquement par l'ADN (**) fixé aux gènes, donc cantonné au noyau. Dès lors, se posent deux problèmes :

1) Quel est le mécanisme par lequel l'ARN intervient dans la synthèse protéinique ?

2) Quel est le mécanisme biochimique de la transmission de l'information génétique ?

Le mécanisme de la protéosynthèse est conçu de la façon suivante :

Chaque amino-acide activé est transporté par un ARN spécifique (ARN de transport = ARNt (***) ou ARN soluble = ARNs)

(*) Les expériences d'hybridation (RICH, 1957) ont permis de savoir que l'ARN se forme par "copie" de l'ADN génétique. Cette formation est catalysée par l'ARN-polymérase (WEISS et GLADSTON, 1958) et inhibée par l'Actinomycine D.

(**) La duplication de l'ADN est semi-conservative (MESELSON et STAHL, 1958) et se fait grâce à l'activité de l'ADN-polymérase (KORNBERG et coll., 1958). Cette réplication de l'ADN suppose le dépliage préalable de la fibre enchevêtrée de l'ADN chromosomique et nécessite une grande quantité d'énergie.

(***) L'ARN de transfert (HOAGLAND et coll., 1958) est formé d'une seule chaine nucléotidique repliée sur elle-même en une sorte de souble hélice. A une extrémité de la chaine se trouve la séquence -CCA. Au niveau de la boucle existent des bases non appariées. L'acide aminé se fixe à l'ARNt grâce à une amino-acyl-sARN-synthétase spécifique. Le transfert au contact des ribosomes est catalysé par l'amino-acide-polymérase; cette enzyme est inhibée par la puromycine.

au contact de l'ARN ribosomal (*). A ce niveau la place de l'amino-acide dans la molécule protéinique en cours de synthèse est réglée par la séquence des nucléotides d'une autre variété d'ARN : l'ARN messager (ARNm) (**). Ce dernier composé prend naissance par copie de l'ADN chromosomique dont la séquence nucléotidique impose, conformément à la loi de complémantarité (base purique ⟷ base pyrimidique) celle de l'ARN messager, porteur de ce fait de la commande génétique. La transmission de cette commande à la protéine à synthétiser devient possible grâce à un code (***) entre les séquences nucléotidiques et les 20 variétés d'amino-acides.

Pour ce qui est de la mécanique de la protéosynthèse proprement dite, elle se déroule suivant un schéma devenu classique. Selon GILBERT (1963), le ribosome progresse le long de l'ARNm en le maintenant et en maintenant en même temps la chaîne polypeptidique qui croît à mesure qu'un nouvel ARNt vient, en délogeant le premier, accrocher à la chaîne polypeptidique, un nouvel acide aminé, (voir schémas).

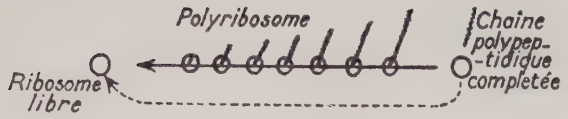
La protéosynthèse n'est pas seulement un phénomène

(*) Chacune des sous-unités ribosomales renferme un ARN à constante de sédimentation bien définie. Dans la plupart des cellules animales, on trouve essentiellement de l'ARN 18 S et 28 S dont la composition en bases est différente (HAREL et coll., 1965).

(**) Les molécules d'ARN messager (BRENNER, JACOB et MESELSON, 1961) sont constituées d'une seule chaine nucléotidique (BAUTZ, 1963). En général, l'ARN messager est instable, ce qui permet l'adaptation au milieu (GROS et coll., 1963).

(***) L'unité de code ou codon est un triplet de 3 bases.

LA PROTEOSYNTHESE



— *L'ARN messager se déplace sur le site de la synthèse protéinique.*

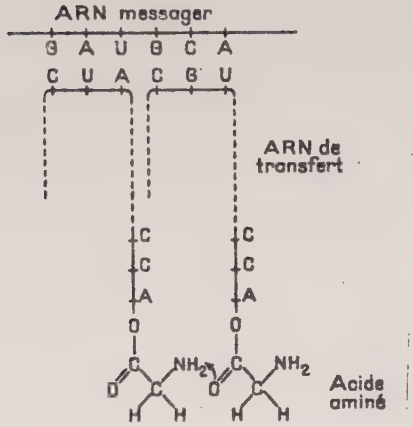
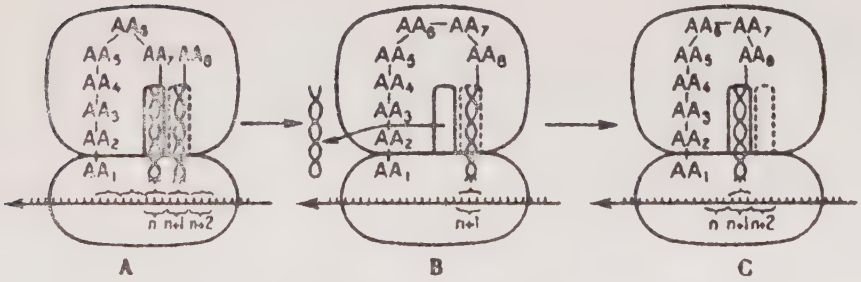


Schéma illustrant la combinaison des triplets de l'ARN messager avec un triplet de chacun des complexes ARN transfert-aminoacide. **Les aminoacides sont ainsi mis en place suivant la séquence des bases azotées dans l'ARN messager. (D'après G. ZUBAY : *Science*, 1963, 140, 1092.)**



— *Représentation schématique de la synthèse des protéines au niveau des polysomes* (d'après WATSON).

On suppose que les ribosomes sont traversés par le RNA messager et que les aminoacyles-s-RNA s'adaptent successivement sur les codons du RNA messager au moment où celui-ci est attaché aux ribosomes.

A. Situation au moment, où un nouvel aminoacyle-s-RNA vient se placer à côté de l'aminoacyle qui le précède dans la formation de la chaîne polypeptidique.

B. Détachement d'un s-RNA de la chaîne polypeptidique et du ribosome avec formation d'une nouvelle liaison peptidique.

C. Préparation pour le placement d'une nouvelle molécule de s-RNA devant continuer l'allongement de la chaîne polypeptidique.

Synthèse des protéines au niveau des polysomes

qualitatif; c'est aussi un processus quantitatif.

Selon MONOD et JACOB (1962), la régulation de la protéosynthèse peut être considérée de la manière suivante :

- l'ARN messager ne correspond pas à un seul gène structural (cistron) mais à un ensemble de gènes (opéron) qui contrôlent en même temps la synthèse de plusieurs protéines (voir schéma).
- l'expression du gène de structure peut être inhibée par une macromolécule spécifique : le répresseur.
- le répresseur lui-même est le produit de l'activité d'un gène particulier : le gène régulateur. Le répresseur peut s'associer spécifiquement à un métabolite. Cette association se traduit soit par une inhibition (système inductible) soit par une activation (système répressible) du répresseur.
- plusieurs gènes de structure adjacents peuvent être associés en une unité d'expression : l'opéron. L'interaction inhibitrice du répresseur à l'égard des gènes d'un même opéron est gouvernée par un segment génétique particulier : l'opérateur, situé à une extrémité de l'opéron, mais distinct des gènes de structure (*).

Quoiqu'il en soit, il convient de remarquer avec DE GROUCHY (1965) :

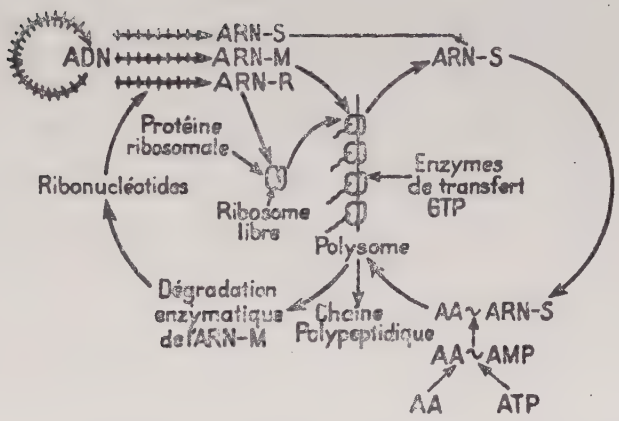
1) qu'une faible partie seulement de l'ADN du génome est consacrée à la synthèse d'ARN ribosomal et d'ARN de transfert (DE GROUCHY, 1965; SCHWEIZER et HALVORSON, 1969) et la majeure partie du génome est inactive et ne sert pas de modèle à l'ARN messager.

2) lorsque la différenciation cellulaire est acquise, certains gènes fonctionnent dans certains tissus et d'autres

---

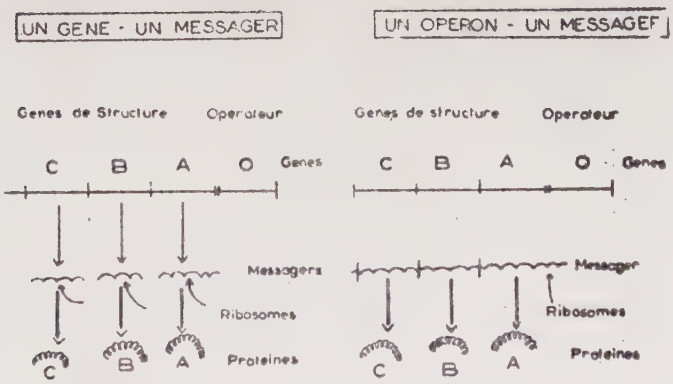
(*) Il y aurait, en plus de cette régulation par l'ADN, une régulation par les protéines cytoplasmiques (GURDON et BROWN, 1965).

LA PROTEOSYNTHESE



— Schéma de la synthèse protéinique. (D'après WATSON.)

La protéosynthèse : schéma général



— Modèles possibles de transcription des opérons génétiques.

Dans l'un des modèles chaque gène appartenant à l'opéron est copié en un message complémentaire qui dirige la synthèse d'une protéine définie. Dans l'autre modèle la transcription de l'opéron est intégrale et aboutit à la synthèse d'un ARN messager unique qui, après combinaison avec les ribosomes et les ARN de transfert, est traduit successivement en 3 protéines distinctes.

La protéosynthèse : régulation

gènes dans d'autres tissus; la différenciation cellulaire résulte probablement de "mises en route" et de "mises en repos" successives de certains gènes (DAJOZ, 1964).

Or, on sait que l'ADN totalement complexé à l'histone est inactif, auusi bien pour ce qui est de sa propre replication que de la synthèse d'ARN (HUANG et BONNER, 1962). Les histones, riches en arginine, inhibent fortement l'expression des messages génétiques; les histones, riches en lysine, sont des inhibiteurs faibles (ALLFREY et coll., 1963). Les histones ne paraissent pas spécifiques du tissu mais de l'espèce (NEIDLE et WAELSH, 1964).

Pour FRENSTER (1966) des mécanismes épigénétiques stables sélectionnent des portions spécifiques du génome en vue de leur transcription. L'histone polycationique stabiliserait de façon non spécifique les doubles hélices de l'ADN, ce qui les empêche de se séparer. Les polyanions nucléaires déplacent partiellement de telles histones en formant des complexes histone - polyanions. L'ADN comportant de telles histones complexées aux polyanions subit une séparation spontanée de ses 2 chaînes : l'une est alors stabilisée par la formation d'hybride avec un ARN répresseur spécifique; l'autre est libre pour servir de modèle à l'ARN messager.

Quant à la protéosynthèse nucléaire, elle s'effectue au cours du cycle de génération cellulaire : phases G1, S, G2, prophase et métaphase. Le taux des protéines nucléaires est variable. Lors de la phase G1, il est deux à trois fois moindre que lors des phases S et G2 (SHAPIRO et LEVINA, 1967).

L'ARN messager interviendrait également selon un processus moins bien connu dans la protéosynthèse nucléaire (BISWAS, 1963).

Par ailleurs, la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines nucléaires paraissent simultanées (SEED, 1964, 1966).

Comment maintenant, à partir de ce que l'on sait sur la morphologie du nucléole, sa composition chimique, son évolution en fonction du cycle cellulaire et sachant le mécanisme et la régulation de la protéosynthèse, imaginer les fonctions possibles du nucléole.

Rôles du nucléole

Les premières observations rapportant la présence de hautes concentrations d'ARN dans le nucléole ont permis d'attribuer à cette structure un rôle dans le transfert de l'information génétique et la régulation de la protéosynthèse (BRACHET, 1940, 1950; CASPERSSON et SCHULTZ, 1940, CASPERSSON, 1950). En fait, la plupart des fonctions attribuées au nucléole (VINCENT, 1955; BUSCH et coll., 1963) n'ont pu être démontrées de façon rigoureuse.

Cependant, les progrès techniques ont permis d'établir des faits de la première importance.

Le nucléole est le site de synthèse de l'ARN ribosomal (FRANKLIN et BALTIMORE, 1962; PERRY et coll., 1961, 1962; EDSTROM et coll., 1961). Il est certain que le nucléole est le site de la synthèse de l'ARN 28 S des ribosomes (BIRSTIEL et coll., 1963; MAC CONKEY et HOPKINS, 1964; MURAMATSU et BUSCH, 1965; MURAMATSU et coll., 1966; BROWN et GURDON, 1964; RITOSSA et SPIEGELMAN, 1965).

On a suggéré également que le nucléole synthétise l'ARN de transfert; ou bien le nucléole est le siège de la méthylation de l'ARNt. Cette méthylation porte sur l'ARNt déjà formé et se fait grâce à un système enzymatique appelé ARN-méthylase, à partir des radicaux méthyl de la méthionine (VINCENT et BALTUS, 1959; BIRNSTIEL et CHIPCHASE, 1961; SIRLIN et coll., 1963; BOREK, 1964).

Le nucléole peut également synthétiser ou modifier l'ARN messager (SIBATINI et coll., 1962; SIRLIN et coll., 1962).

Mais ces deux dernières fonctions ne sont pas démontrées de façon indiscutable, bien qu'elles soient très probables.

Il est possible, enfin, que le nucléole soit directement actif dans la protéosynthèse (FICQ, 1955; FICQ et BRACHET, 1956; WADDINGTON et SIRLIN, 1959; KING et BURNETT, 1959; OLSZEWSKA, 1959; BIRNSTIEL et HYDE, 1963; MURAMATSU et coll., 1963; DESJARDINS et BUSCH, 1964; BIRNSTIEL et coll., 1964). Les études autohistoradiographiques ont montré que la protéosynthèse intranucléolaire intéresse les protéines ribosomales et les histones.

Le rôle du nucléole ne peut être compris qu'à la lumière de ce que l'on sait sur les fonctions du noyau et le métabolisme cellulaire en général (ZAJDELA, 1961).

On sait que le noyau intervient dans :

- les processus de sécrétion (synthèse de l'ARN, synthèse des protéines nucléaires, contrôle de la protéosynthèse cytoplasmique);
- le contrôle du mouvement cellulaire (MITCHISON, 1966);
- la morphogénèse (BRACHET, 1966).

Dans tous ces phénomènes quelle est la part dévolue au nucléole ? Joue-t-il un rôle dans la division cellulaire?

Le rôle du nucléole dans les processus de sécrétion est actuellement bien établi. Les résultats des mesures quantitatives et les déterminations histochimiques et chimiques des acides nucléiques, montrent que les volumes nucléolaires sont habituellement les plus élevés au cours de la période d'accroissement de l'ARN nucléolaire, qui précède toujours une protéosynthèse très active (STOWELL, 1963).

La synthèse de l'ARN ribosomal est directement codée par l'ADN qui existe sous forme de réseau intranucléo-

laire (JACOB, 1967) (*). Dans un travail remarquable, MILLER et BEATY (1969) ont pu isoler cet ADN et visualiser les gènes nucléolaires codant pour l'ARN ribosomal. L'objectivation de ces gènes a été possible, car plusieurs molécules d'ARN ribosomal sont synthétisées sur chaque gène. (**)

Cette transcription de l'ADN nucléolaire semble responsable de l'indépendance apparente de la synthèse de l'ADN nucléolaire par rapport à celle de l'ADN du reste du noyau (GAFFNEY et NARDONE, 1968).

C'est donc surtout par l'intermédiaire de l'ARN ribosomal que le nucléole intervient dans les processus de sécrétion.

Pour ce qui est du contrôle du mouvement cellulaire, il ne semble pas que le nucléole ait un rôle à jouer, bien qu'il soit lui-même mobile.

Plus intéressant est le rôle du nucléole dans la morphogénèse. En effet, différentes modifications morphologiques ont été décrites au cours du développement. Si l'on admet que les changements structuraux de la chromatine constituent un mécanisme épigénétique qui contrôle la transcription des gènes, il paraît probable qu'il y ait une dérepression progressive de la chromatine associée au nucléole au cours de l'embryogénèse; c'est à ce facteur que sont dues les modifications de l'architecture nucléolaire. Ce processus permet de déréprimer les gènes codant l'ARN ribosomal (JACOB, 1969).

(*) L'ADN nucléolaire se réplique tardivement (CHARRET, 1969); il continue de se répliquer après l'ADN du reste du noyau, à la fin de la phase S.

(**) Les cistrons pour l'ARN ribosomal se répliquent ou continuent de se répliquer après ceux des autres catégories d'ARN.

Enfin, il semble bien que le nucléole soit indispensable à la division cellulaire, comme le prouvent les différentes expériences de destruction élective des nucléoles. Ceci se comprend aisément par les différentes fonctions qui lui sont attribuées.

Pour mieux préciser certains points de la physiologie du nucléole, on peut réaliser une véritable cytopathologie expérimentale de cet organite. Cette cytopathologie a en outre l'avantage, dans les cas où la cellule est soumise à l'action de substances connues pour leur effet carcinogène ou anti-carcinogène, de donner un aperçu des lésions initiales au cours de la cancérisation ou de la restitution après chimiothérapie.

CYTOPATHOLOGIE EXPERIMENTALE DU NUCLEOLE

Rôle des agents physiques

- Action de la chaleur

Sous l'action de la chaleur (DUPRAT, 1969), les nucléoles, habituellement ovoïdes et d'aspect homogène in vivo (en contraste de phase), deviennent d'abord vésiculeux pendant le choc thermique pour présenter ensuite l'aspect d'un réseau très lâche, entouré de plusieurs amas d'un matériel très contrasté. La fragmentation des nucléoles en amas dispersés dans le nucléoplasme constitue le stade final de cette évolution.

- Action des rayons ultra-violets (UV)

L'irradiation ultra-violette du noyau à l'exclusion du nucléole (MONTGOMERY et coll., 1966) produit une lésion nucléolaire identique à celle induite par l'acridine orange, la proflavine et la mitomycine C. L'irradiation du nucléole seul produit des lésions du même type que celles observées dans les premiers stades de l'exposition des cellules à la 4-nitro-quinoline-N-oxyde, l'actinomycine D et les radiations ionisantes.

L'irradiation ultra-violette produit une désagrégation des constituants nucléolaires (MORENO et VINZENS, 1969).

- Micro-irradiation au laser

La micro-irradiation au laser (BERNS et coll., 1970) résulte en une réduction du nombre des nucléoles; les nucléoles restants paraissent plus gros que normalement. Il y aurait peut-être une réaction de compensation (hypertrophie en cas de réduction numérique).

Rôle des agents chimiques

La séparation et la redistribution des composants macromoléculaires du nucléole constituent une entité morphologique distincte et probablement spécifique (REYNOLDS et coll., 1963, 1964) dont la signification demeure cependant obscure.

On connaît plusieurs substances capables de la provoquer :

- la 4-Nitroquinoline-N-Oxyde (REYNOLDS et MONTGOMERY, 1962; REYNOLDS et coll., 1963);
- l'Actinomycine D (SCHOEFL, 1964; REYNOLDS et coll., 1964);
- la Mitomycine C (LAPIS et BERNHARD, 1965);
- l'Aflatoxine (BERNHARD et coll., 1965);
- la Proflavine et l'Acridine orange (REYNOLDS et MONTGOMERY, 1965; SIMARD, 1966).

Ce phénomène morphologiquement bien caractérisé a été appelé "ségrégation nucléolaire" (BERNHARD et coll., 1965).

Les modifications morphologiques ont lieu, dans les cas typiques, avec des doses faibles et des temps courts. Elles commencent par l'apparition d'un sillon de séparation entre le nucléole et la chromatine nucléolo-associée. Le nucléole devient sphérique et diminue progressivement de taille. Sa portion fibrillaire se condense et migrevers la périphérie. Proportionnellement, la zône granulaire devient la plus importante et la

zône fibrillaire acquiert une forte densité électronique. Puis, c'est la ségrégation franche des composants en fibrilles, granules, partie amorphe et zône contrastée.

Si le temps d'action est prolongé, la zône granulaire se disperse dans le nucléoplasme et disparaît peu à peu. Finalement, il ne reste dans le nucléole que les zônes fibrillaire et amorphe (SCHOEFL, 1964; JEZEQUEL et BERNHARD, 1964; REYNOLDS et coll., 1963, 1964; STENRAM, 1964, 1966; STEVENS, 1964; SEITE et coll., 1966; GEUSKENS, 1966).

La diversité d'action et de structure des inhibiteurs métaboliques provoquant la "ségrégation nucléolaire" explique mal leur action commune sur le nucléole. Ainsi la "ségrégation nucléolaire" est produite aussi bien par des antimétabolites, que des agents cancérigènes voire même des agents anticancérigènes.

Le mécanisme d'action typique est celui de l'Actinomycine D. Cette dernière inhibe de façon sélective la synthèse de l'ARN, ADN-dépendant (REICH et coll., 1961, 1962). L'Actinomycine D agit en bloquant indirectement l'action de l'ARN-polymérase; cette enzyme est active au niveau de la petite rainure de la double hélice et est sujette à une inhibition stérique de l'Actinomycine D qui intervient au niveau de la grande rainure (REICH, 1964; CLARK, 1967, sur les cellules HeLa).

L'action préalable de la Thioacétamide sur les cellules hépatiques n'empêche pas la "ségrégation nucléolaire" par l'Actinomycine D.

Seuls les antibiotiques comme l'Actinomycine D, la Proflavine et le Bromure d'éthidium provoquent une "ségrégation nucléolaire" typique, de façon constante.

- La Thioacétamide, substance cancérigène, produit des altérations nucléolaires particulières : anisonucléolinose, accroissement de volume et de l'incorporation d'Uridine tritiée (MIRONESCU et coll., 1968, 1969). Après action successive

d'ADNase et d'ARNase sur des cellules traitées à la Thioacétamide, il se produit une fusion nucléolaire (UNUMA et coll., 1968).

- L'Ethionine produit des lésions particulières dues à une inhibition de l'ARN mais le mécanisme d'action est inconnu (SCHINOZUKA et coll., 1968).

- La Quinacrine aurait une action analogue à celle de l'Actinomycine D (FEDORKO et HIRSCH, 1969).

- L'ARNase entraine une vacuolisation nucléolaire.

- La Vincristine (antimitotique extrait de Vinca Rosea et utilisé en thérapeutique) ne semble pas donner d'altérations nucléolaires au niveau des cellules HeLa (GEORGE, 1965).

Enfin, il faut mentionner que les nucléoles altérés sous l'action des divers antimétabolites et carcinogènes peuvent être isolés par les méthodes habituelles sans que la "ségrégation nucléolaire" disparaisse; ils ne semblent pas plus fragiles (HARRIS et coll., 1968).

Ainsi, l'on dispose d'un certain nombre d'agents dont on connaît assez bien le point d'impact au niveau du nucléole. Ceci permet, outre d'approfondir nos connaissances sur la physiologie du nucléole, de fournir des images de référence pour comparer les lésions nucléolaires expérimentales avec celles susceptibles d'être observées en pathologie oncologique.

Au total, le nucléole est essentiellement une structure complexe au niveau de laquelle s'élaborent : surtout l'ARN ribosomal (ou ses précurseurs); probablement l'ARN messager; et l'ARN de transfert. Les 3 variétés d'ARN sont codées par le réseau d'ADN intranucléolaire. Ce n'est en somme qu'une zône du chromosome au niveau de laquelle se fabrique l'ARN. Cette zône peut être :

- l'organisateur nucléolaire lorsque le chromosome est

fortement spiralé,

- la chromatine nucléolo-associée, la chromatine intranucléolaire et le réseau d'ADN intranucléolaire, lorsque le chromosome est déroulé.

De ce fait, cette structure joue un rôle capital dans le protéosynthèse et par ce biais dans tout le métabolisme cellulaire. Il est aisé de comprendre dès lors que la cellule cancéreuse puisse présenter des lésions nucléolaires caractéristiques.

o

o o

DEUXIEME PARTIE

*

* *

L E N U C L E O L E

D A N S

L A C E L L U L E C A N C E R E U S E

* *

*

P L A N

DONNEES MORPHOLOGIQUES

- Nombre
- Taille
- Forme
- Structure

DONNEES BIOLOGIQUES

1) Composition chimique

2) Physiopathologie

NUCLEOLE ET THEORIES DE LA CARCINOGENESE

1) Théorie métabolique

2) Théorie virale

3) Théorie génétique

DONNEES MORPHOLOGIQUES

- Nombre

Il est connu depuis longtemps que l'augmentation du nombre des nucléoles par noyau est l'un des critères de malignité de la cellule.

Ainsi, dans le tumeur de WALKER, le nombre moyen de nucléoles est de 1,5 mais peut aller de 1 à 6 par noyau. Le nombre moyen de nucléoles des lymphocytes leucémiques est plus élevé que la normale.

La coloration au chromotrope 2R (GILLIS et SALM, 1964) donne des résultats remarquables pour la mise en évidence des nucléoles des cellules leucémiques. Cette technique permet la différenciation des diverses cellules leucémiques sur l'aspect des nucléoles (SALSBURY, 1967). Les lymphoblastes malins renferment 2 nucléoles par noyau; alors que les myéloblastes et les monoblastes en renferment, en général, plus de 2.

Dans les cellules HeLa en culture, le nombre de nucléoles varie en fonction du milieu (SWIFT, 1959). Dans les solutions salines pures, ce nombre est de 3,7 en moyenne mais varie de 1 à 8. Cependant, si le milieu est convenablement ajusté, la moyenne n'est plus que de 1,7 nucléoles par noyau.

L'augmentation du nombre des nucléoles peut être en relation avec l'aneuploïdie des cellules cancéreuses (SWIFT, 1955; OBERLING et BERNHARD, 1960).

Quoiqu'il en soit, cette augmentation du nombre des nucléoles n'est pas spécifique et ne prend sa valeur qu'en association avec d'autres signes de malignité.(*)

- Taille

L'hypertrophie nucléolaire est, sans doute, le signe

(*) Pour LEWIS (1943), il n'y a aucune différence numérique entre les nucléoles des cellules normales et ceux des cellules cancéreuses.

le plus fréquemment rencontré dans les cellules malignes. L'augmentation de taille du nucléole est proportionnellement plus importante que celle du noyau, d'où une augmentation du rapport nucléolo-nucléaire (SAXEN, 1926; KARP, 1932; ZADEK, 1933; MAC CARTHY et coll., 1934; FIDLER, 1935; MAC CARTHY, 1936, 1937; QUENSEL, 1938; CASPERSSON et SANTESSON, 1942; LETTRE et SIEBS, 1954; COWDRY, 1955; SAVINOVSKAIA, 1958).

Des mesures soigneuses effectuées par STEMRAM (1956, 1958) montrent que dans les cellules d'hépatomes induits par les colorants azoïques (produits cancérigènes), le volume nucléolaire est d'approximativement 3,8 μ^3 contre 1,8 μ^3 pour le foie normal. Ainsi, l'administration de colorants azoïques entraine une hypertrophie nucléolaire (CASPERSSON, 1940; STEMRAM, 1958); mais cette hypertrophie n'est pas pathognomonique de la malignité (AYRES, 1948; COWDRY et PALETTA, 1941; LUDFORD, 1954; SOPERSEN et coll., 1953).

Une hypertrophie nucléolaire a également été rapportée au cours des premiers stades de la carcinogénèse de la peau de Souris (COOPER, 1956; COWDRY et PALETTA, 1941).

- Forme

L'irrégularité de forme des nucléoles de la cellule maligne a fréquemment été rapportée (SAXEN, 1926; LUDFORD, 1922; QUENSEL, 1928; ZADEK, 1933; FIDLER, 1935; AYRES, 1948; REITALU, 1957). Elle consiste généralement en une désagrégation de la structure normale et s'accompagne fréquemment d'irrégularités de la chromatine nucléolo-associée ainsi que d'anomalies de position (SWIFT, 1959; LETTRE et SIEBS, 1954; HAMEM, 1951; PAGE et coll., 1958; LOVE, 1960, 1962; LOVE et coll., 1959, 1961; MAC MASTER-KAY et TAYLOR, 1958; STOIC, 1959, 1961).

- Structure

Les données de la Microscopie Optique sont particulièrement pauvres; aucun signe n'est véritablement caractéristique de la cellule maligne; ce n'est que la conjonction

d'anomalies de nombre, de taille et de forme qui emporte la conviction du cytopathologiste.

L'avènement de la Microscopie Electronique a suscité l'espoir de pouvoir objectiver des lésions nucléolaires pathognomoniques des cellules cancéreuses.

Les études ont porté aussi bien sur des cancers humains que sur des tumeurs expérimentales chez l'animal. Les premières observations se sont révélées décevantes (LUDFORD, 1954; OBERLING et BERNHARD, 1955) à cause des difficultés techniques; les méthodes de fixation, d'inclusion et de contraste étant inadéquates pour révéler la structure fine du nucléole (BERNHARD, 1963). Si l'on a pu retrouver assez fréquemment des lésions nucléaires, aussi bien in situ (LEPLUS et coll., 1961; VASQUEZ et PAVLOVSKY, 1964) que sur des noyaux isolés (ZBARSKY et coll., 1962; CRAWLEY et HARRIS, 1963); il n'y a apparemment pas de lésions nucléolaires.

Cependant, avec les progrès techniques, des lésions nucléolaires ont pu être décrites.

Ainsi dans les cellules réticulaires hodgkiniennes, on note un ou plusieurs nucléoles très hypertrophiés, présentant de nombreux corpuscules denses et irréguliers (de 0,15 à 0,3 µ de diamètre), attachés au nucléolonema (LEPLUS et coll., 1961; BERNHARD, 1963). Ces corpuscules sont eux-mêmes constitués de fins granules. Ces images de "nucléoles mouchetés" sont à rapprocher des nucléoles de cellules infectées par le virus polyome (BERNHARD et coll., 1959).

L'utilisation des méthodes de cytochimie ultrastructurale permet une analyse plus précise des lésions (BATOLO et INFERRERA, 1967). L'examen de cellules d'un certain nombre de tumeurs humaines montre la présence, à côté des nucléoles hypertrophiés classiques, de nucléoles à structure compacte, de forme sphérique, paradoxalement réguliers et aux limites nettes. Ces nucléoles renferment dans leur région centrale 1 à 3 formations (de 200 à 500 mµ de diamètre) nettement délimitées du

reste du corps nucléolaire. Ces zônes de faible densité (densité comparable à celle de la chromatine nucléolo-associée) sont à distinguer des vacuoles nucléolaires qui sont dépourvues de structure, et des nucléolins des auteurs classiques. A haute résolution, ces zônes claires se révèlent constituées d'un réticulum de filaments minces (de 40 à 50 Å de diamètre) qui diffèrent des fibrilles du reste du nucléole, par leur plus grande dispersion et leur moindre affinité pour les colorants.

Les résultats des études cytochimiques suggèrent que ces zônes claires sont constituées d'ARN dont le degré de polymérisation est différent de celui de l'ARN nucléolaire normal.

Par ailleurs, des mesures quantitatives (SMETANA et coll., 1966).semblent indiquer une variation des proportions relatives des composants nucléolaires (fibrillaire et granulaire) (*). Les fibrilles de ribonucléoprotéines sont en étroite relation avec les structures nucléolaires renfermant de l'ADN (NARAYAN et coll., 1966).

L'étude de la transformation néoplasique d'hépatocytes de Rat par le DAB (diméthylamino-azo-benzène) montre que ce sont les régions hépatiques basophiles qui présentent des lésions précancéreuses. On note à ce niveau des nucléoles particulièrement saillants, composés de granules principalement; cet aspect est accompagné d'une augmentation des granules interchromatiniens (KARASAKI, 1967).

Il semble donc que si les techniques de routine en Microscopie Electronique n'offrent pas d'avantages sur la Microscopie Optique, les méthodes plus fines permettent de mettre en évidence des lésions nucléolaires caractéristiques.

(*) Rappelons que les éléments fibrillaires renferment de l'ARN 28 S (ARN ribosomal) et les éléments granulaires de l'ARN 6 S (correspondant très probablement à l'ARN de tranfert).

Cependant, les lésions observées ne sont ni constantes ni spécifiques (BERNHARD et GRANBOULAN, 1963).

DONNEES BIOLOGIQUES

1) Composition chimique

L'ARN nucléolaire de la cellule cancéreuse diffère de celui de la cellule normale (NAKAMURA et coll., 1967) (*); mais la composition en bases des différents tissus tumoraux est analogue.

L'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé de la tumeur de WALKER est plus riche en cytosine et plus pauvre en adénine comparativement au foie normal (MURAMATSU et BUSCH, 1964).

Ces faits sont retrouvés par SMITH et coll. (1967) (**) et BUSCH et coll. (1968). Il est à noter que la composition en bases des divers ARN nucléolaires des tumeurs est variable; cependant l'ARN 45 S nouvellement synthétisé semble avoir la même composition pour toutes les tumeurs.

Les différences dans la composition en bases des ARN des tumeurs paraissent liées aux propriétés malignes de la cellule, surtout pour ce qui concerne l'ARN 45 S, car le foie en régénération, dont les cellules sont à croissance très rapide

---

(*) La teneur en acide cytidilique est plus élevée, celle en acide adénylique est plus basse que la normale.

(**) Le nucléole de la tumeur de WALKER renferme principalement de l'ARN 6 S, 28 S, 35 S, 45 S, 55 S; occasionnellement de l'ARN 18 S. L'analyse de la composition en bases de l'ARN 45 S nouvellement synthétisé montre une teneur très basse en acide adénylique, mais l'ARN 6 S a une teneur plus élevée en acides adénylique et uridylique. La composition en bases de ces fractions diffère notablement de celle des tissus normaux.

ne présente pas cette anomalie (MURAMATSU et coll., 1968)(*).

2) Physiopathologie

Selon l'hypothèse de STEDMAN (1950), les histones interviennent dans la régulation de l'activité génétique par répression des gènes. Cette conception permet d'expliquer l'inhibition des cellules cancéreuses par les histones. Dans certaines cellules néoplasiques, la teneur en histones est basse (CRUFT et coll., 1954; PREVOSCHIKOVA, 1954). Cependant, il ne semble pas que les histones des tissus tumoraux exercent une activité inhibitrice spécifique par répression génétique (BLAZSEK et GYERGYAY, 1965).

Les recherches autohistoradiographiques ont permis de retenir les faits suivants :

- Dans les cellules malignes, un plus grand marquage se produit au niveau de la zône fibrillaire du nucléole par rapport à la zône granulaire, ce qui suggère une migration des éléments nucléolaires de la zône fibrillaire vers la zône granulaire (UMUMA, 1968) (**).

- Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN (DUPREZ et coll., 1968).

(*) Pour d'autres auteurs (CHATTERJEE et coll., 1968), les cellules malignes ne présentent pas de différence de composition chimique par rapport aux cellules normales, en ce qui concerne les protéines; mais la teneur en acides nucléiques est plus basse. Cependant, ces résultats, obtenus par analyse chimique globale de la cellule, ne sont pas très précis.

(**) Les particules ribonucléoprotéiques isolées des tumeurs de Souris, ne sont pas analogues aux ribosomes par leurs propriétés biochimiques et physico-chimiques, mais semblent représenter des intermédiaires dans la formation des ribosomes de la cellule tumorale (ISAVA et KAWASCHIMA, 1969).

- Au cours du processus de cancérisation, s'observe un accroissement de l'activité spécifique de l'ARN nucléolaire (WINTZERITH et coll., 1968), d'où une synthèse accrue d'ARN ribosomal.

Par ailleurs, les nucléoles des cellules malignes sont le siège du phénomène de "ségrégation nucléolaire" lorsqu'ils sont soumis à l'action de l'Actinomycine D ou de l'Aflatoxine (JOURNEY et GOLDSTEIN, 1961; UNUMA et BUSCH, 1967; FLOYD et coll., 1968).

Dans les cellules ascitiques de tumeurs d'EHRLICH, les nucléoles se constituent de la même façon que dans les cellules normales, mais il ne semble pas qu'il y ait intervention d'un organisateur nucléolaire (YASUZUMI et SUGIHARA, 1965).

NUCLEOLE ET THEORIES DE LA CARCINOGENESE

1) Théorie métabolique

Il est remarquable que certaines lésions nucléolaires, dues à des antimétabolites ou à des agents carcinogènes, soient très proches de celles observées en pathologie oncologique. Ainsi, on pourrait suggérer que le mécanisme intime de la cancérisation serait un blocage de la transcription de l'ADN nucléolaire.

2) Théorie virale

Certaines lésions nucléolaires, notamment l'aspect "moucheté", observé dans certaines cellules hodgkiennes, se retrouvent dans les cellules infectées par des virus (*).

(*) Dans les cellules Kb infectées par l'adénovirus 12 (LEBUIS, 1966), le nucléole se vacuolise progressivement; il se produit ainsi une condensation du nucleolonema fibrillaire aboutissant à la formation de granules. Certains de ces derniers migrent dans les vacuoles nucléolaires.

Le nucléole est directement impliqué dans la synthèse virale (JACOB, 1968). Dans les tumeurs primitives de LUCKE, on assiste d'abord à une redistribution de la zône fibrillaire; puis les zônes fibrillaires s'accroissent, alors que les régions particulaires se dispersent. Les fibrilles aboutissent alors à de gros amas denses aux électrons, qui se fragmentent un peu plus tard, pour donner naissance à des particules virales directement objectivables.

5) Théorie génétique

Certains faits, parmi ceux énoncés plus haut, permettent de penser qu'au cours de la cancérisation, il se produit un accroissement du nombre de gènes actifs par dérépression des gènes normalement inactifs. Il en résulterait une augmentation quantitative des ARN et des protéines synthétisées. Ceci permettrait également d'expliquer la différence qualitative de la composition en bases des ARN des tumeurs.

o

o o

TROISIEME PARTIE

*
* *

O B S E R V A T I O N S P E R S O N N E L L E S

* *
*

Nos observations personnelles ont été effectuées tant en Microscopie Optique qu'en Microscopie Electronique.

Observations en Microscopie Optique

Buts :

Nous avons cherché dans ce travail à étudier essentiellement le nombre, la morphologie et la topographie des nucléoles des cellules malignes dans les divers cancers que nous avons été amené à analyser.

Matériel et méthode :

Notre travail a porté sur 246 cas de cancers que nous avons eu l'occasion d'observer dans le Département de Cytologie Fonctionnelle et Expérimentale de l'Institut de Biologie Cellulaire, au cours des années 1968 et 1969. Ces 246 cas représentent approximativement 15% des affections dépistées par cytodiagnostic et se répartissent de la façon suivante :

Leucoses aiguës lymphoblastiques	31
Leucoses aiguës myeloblastiques	7
Leucémies lymphoïdes chroniques	8
Leucémies myéloïdes chroniques	16
Maladies de HODGKIN	15
Maladies de MAHLER	9
Réticulo-sarcomes ganglionnaires	27
Lympho-sarcomes ganglionnaires	13
Tumeurs solides diverses	43
Adénites métastatiques d'origines variées	77

Les prélèvements ont été obtenus par ponction à l'aiguille. On a réalisé ensuite des frottis qui ont été colorés par la méthode de MAY-GRÜNWALD-GIEMSA. Les lames ont été examinées avec l'objectif à immersion. Le dénombrement des nucléoles a été effectué sur 10 noyaux pour chaque lame; le chiffre retenu représente la moyenne.

Les résultats obtenus sont groupés ci-dessous en 2 rubriques : - leucémies et hématosarcomes
- tumeurs solides et adénites métastatiques de tumeurs solides.

Leucémies et Hématosarcomes

variété de cancer	nombre moyen	nombre de cas	observations
leucoses aiguës lymphoblastiques	0,1 à 0,5 0,6 à 1,0 1,2.	19 8 1	Les nucléoles sont généralement petits, mal dessinés. La chromatine est fine. On note parfois une chromatine nucléolo-associée. On retrouve souvent des incisures nucléaires et des vacuoles intranucléaires.
après traitement	0,1 à 0,3	3	
leucoses aiguës myéloblastiques	0,1 à 1,0 1,1 à 2,0 2,9	4 2 1	Nucléoles petits, assez nets, présentant parfois une chromatine nucléolo-associée.
leucémies lymphoïdes chroniques	0,1 à 0,5 0,6	7 1	
leucémies myéloïdes chroniques	0,1 à 0,5 0,6 à 1,0	14 2	Nucléoles jeunes (ressemblent à ceux des myéloblastes).
maladies de HODGKIN	0,1 à 1,0 1,1 à 2,0 2,1 à 3,0 3,3	1 7 4 1	Nucléoles nettement malins; soit hypertrophiés (plus de 7 u) et irréguliers, entourés d'un liseré chromatinien et accolés à la membrane nucléaire; soit faiblement dessinés, petits ou de taille inégale.
après traitement	1,3 et 1,6	2	Nucléoles petits à limites nettes ou bien gros et irréguliers.

variété de cancer	nombre moyen	nombre de cas	observations
maladies de HAHLER	0,1 à 1,0 1,1 et 2,1	6 2	Nucléoles généralement petits, mal dessinés; parfois bien dessinés, à l'emporte-pièce.
après traitement	0,5	1	
réticulo-sarcomes	0,1 à 1,0 1,1 à 2,0 2,1 à 3,0	4 17 6	Nucléoles très hypertrophiés, nets, à contours irréguliers, parfois coalescents, accolés à la membrane nucléaire, généralement basophiles. Rarement, nucléoles petits. Noyaux irréguliers, à chromatine fine, souvent encochés, voire bourgeonnants, présentant de nombreuses vacuoles.
lympho-sarcomes	0,1 à 1,0 1,1 à 2,0 2,1 à 3,0 4,5	7 3 1 1	Nucléoles très petits, disséminés dans le noyau. Ce dernier présente une chromatine d'aspect réticulé. Nombreuses mitoses.
après traitement	0,4	1	

Tumeurs solides

variété de cancer	nombre moyen	nombre de cas	observations
adénocarcinome du sein	0,1 à 1,0 1,1 à 2,0 2,1 à 3,0 3,5	5 11 2 1	Nucléoles très nets, basophiles, de forme irrégulière, hypertrophiés (jusqu'à 15 µ), présentant parfoi un liseré chromatinien périnucléo laire. Nucléoles souvent accolés la membrane nucléaire. Exception- nellement, nucléoles petits ou de taille inégale.
cancer du foie	0,1 0,7 à 1,4	1 3	Cellules ascitiques. Petits nucléoles basophiles.
cancer de l'estomac	0,3	1	Nucléoles basophiles.
adénocarcinome de la parotide	0,3 à 1,4	3	
épithélioma du poumon	0,4	1	
épithélioma cutané	1,1 et 1,3	2	basocellulaire.
cancer du testicule	0,9	1	
cancer de l'utérus	0,7	1	métastase hépatique.
cancer de la thyroïde	0,7 et 2,1	2	
sympathoblastome	0,3 et 0,5	2	métastase médullaire.

variété de cancer	nombre moyen	nombre de cas	observations
ostéo-sarcome	0,6 et 1,1	2	
cancer du cavum :	0,1 à 0,7	3	indifférencié.
sarcome dictio-cytaire	1,0	1	vacuoles nucléaires.
mélanome cutané	2,1	1	Nucléoles basophiles; nombreuses mitoses.
	Adénites métastatiques		
cancer du cavum	0,1 à 1,0 1,1 à 2,0 2,1 à 3,0 3,3	4 4 2 1	Nucléoles basophiles ou acidophiles hypertrophiés (jusqu'à 10 u), irréguliers. Noyaux bourgeonnants.
Adénocarcinome du sein	0,1 à 1,0 1,1 à 2,0 2,3	7 4 1	Présence de vacuoles nucléaires parfois accolées au nucléole.
..... après traitement	0,2	1	
cancer de la thyroïde	0,3	2	
cancer de la parotide	0,5 à 1,0	3	
cancer de la sous-maxillaire	0,4 à 0,9	3	Nucléoles basophiles.
cancer du foie	0,2 à 3,3	3	Nucléoles très nets, saillants.

variété de cancer	nombre moyen	nombre de cas	observations
cancer de l'estomac	1,6 à 3,1	3	Nucléoles acidophiles
épithélioma de l'oeso-phage	0,4 à 0,9	3	
épithélioma de l'amyg-dale	0,5 et 1,3	2	
cancer du col utérin	0,3 à 0,6	3	Nucléoles très nets.
cancer du corps uté-rin	0,9	1	
épithélioma de l'oro-pharynx	0,5	1	Nucléoles acidophiles.
cancer du larynx	1,1 et 1,9	2	
épithélioma du vestibu-le nasal	0,6	1	
épithélioma du sinus piriforme	0,4	1	
cancer de la luette	0,5	1	
cancer du poumon	1,9	1	Nucléoles très irréguliers.
ostéo-sarcome	0	1	

variété de cancer	nombre moyen	nombre de cas	observations
sarcome de la fesse	0,4 et 1,5	2	Nucléoles ovoïdes, à chrom dense.
X	0,1 à 1,0 1,1 à 2,0 2,1 à 3,0	10 6 4	Nucléoles de taille variab acidophiles ou basophiles, guliers.
cancer de la lèvre ..... après traitement	0,3	1	Noyaux pycnotiques

Discussion :

Ces données montrent tout d'abord la grande varia du nombre de nucléoles avec le type de cancer, et cancer à l'autre, pour la même variété de cancer. façon générale, on peut dire que la cellule cancé renferme plus de nucléoles que la cellule normale dant, les chiffres moyens ne sont pas très élevée c'est la variation du nombre absolu de nucléoles noyau qui est la plus caractéristique. Exemple : 2.1.1.1.2.1.6.3.5.1. = 2,0 (adénocarcinome du sei Cette augmentation du nombre global des nucléoles compagne fréquemment d'une hypertrophie nucléolai d'une inégalité de taille et d'une irrégularité d des nucléoles; ces derniers sont souvent accolés membrane nucléaire.

o

o o

Observations en Microscopie Electronique

Nos recherches micro-électroniques peuvent paraître minimes. Ceci s'explique par le fait qu'une telle étude nécessite un matériel assez important dont nous n'avions pas pu disposer à loisir étant donné les diverses sollicitations dont est l'objet le Département de Microscopie Electronique. En fait, un tel travail nécessite la mise en place d'un Département de Microscopie Electronique réservé à la Cytopathologie. Par ailleurs, la technique microélectronique étant assez longue, nous n'avons pu étudier la structure fine du nucléole que dans quelques cas.

La technique a été la suivante :
Les prélèvements ont été fixés soit à la Formaldéhyde à 3% dans la tampon de CARLSSON pendant 15 minutes avec une post-fixation pendant 2 heures à l'acide osmique à 1% dans le tampon de CARLSSON; soit à la Glutaraldéhyde à 3% dans le tampon Cacodylate à 0,2 M pendant 2 heures 30 avec une post-fixation à l'acide osmique à 1% dans le tampon Cacodylate à 0,2 M pendant 1 heure 30.
L'inclusion a été effectuée dans l'Epon.
Les coupes ont été obtenues à l'aide d'un ultramicrotome LKB.
Les coupes ultra-fines ont été colorées selon la technique de la double coloration : acétate d'uranyle (selon WATSON) et citrate de plomb (selon REYNOLDS).

Résultats

Les nucléoles sont très hypertrophiés. Ils présentent parfois une topographie centrale, mais très souvent, ils sont accolés à la membrane nucléaire. Nous avons pu observer également, lorsque le nucléole est central, des élongations nucléolaires vers la membrane nucléaire (représentant sans doute du matériel nucléolaire en transit).
Le nucléole possède un aspect global spongieux ou réticulé
Sa structure fine est classique avec un nucleolonema gra-

nulo-filamenteux et une pars amorpha claire. Nous n'avons pas observé, de façon indiscutable, des zônes claires ou un aspect de nucléole "moucheté".
En fait, seule la mise en jeu de digestions enzymatiques permet une étude complète de la structure fine du nucléole de la cellule maligne.

CONCLUSION GENERALE

Le nucléole est un système biologique très intéressant pour l'étude du métabolisme cellulaire et de sa régulation. Cependant, si certains faits sont actuellement bien établis, beaucoup de problèmes demeurent en suspens. Seule, une étude à l'échelon moléculaire peut permettre de les résoudre.

Par là-même, la responsabilité du nucléole dans le processus de cancérisation deviendra plus claire.

C'est à la fois dans le sens de l'approfondissement de nos connaissances sur le nucléole de la cellule normale et dans celui de l'étude du nucléole au cours de la carcinogénèse que nous comptons poursuivre nos recherches ultérieures.

*
* *

*

* *

-=- B I B L I O G R A P H I E -=-

* *

*

1 - AFZELIUS B.A. : The nucleus of Noctilucas scintillans. Aspects of nucleocytoplasmic exchanges and the formation of nuclear membrane.
J. Cell Biol., 1963, 19, 1, 229-238

2 - ALBUQUERQUE R.M. and SERRA J.A. : Nucleolar composition and the nucleolar zones of the chromosomes.
Acta Biol., 1951, 3, séries A, 187

3 - ALLFREY V.G., LITTAU V.C. and MIRSKY A.E. : On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus.
Proc. Natl. Acad. Sc., 1963, 49, 414

4 - ALLFREY V.G., LITTAU V.C. and MIRSKY A.E. : Methods for the purification of thymus nuclei and their application to studies of nuclear protein synthesis.
J. Cell Biol., 1964, 21, 2, 213-232

5 - AMANO M., LEBLOND C.P. and NADLER N.J. : Radioautographic analysis of nuclear RNA in mouse cells revealing three pools with different turnover times.
Exp. Cell Res., 1965, 38, 2, 314-340

6 - BARR M.L. : The significance of the sex chromatin.
Int. Rev. Cytol., 1966, 19, 35-95.

7 - BASERGA R. : The relationship of the cell cycle to tumor growth and control of cell division : a review.
Cancer Res., 1965, 25, 581-595

8 - BASSLEER R. : Effets de la ribonucléase sur les synthèses de protéines nucléaires totales et d'acide désoxyribonucléique dans les fibroblastes cultivés in vitro.
C.R.Soc.Biol., 1965, 159, 11, 2265-2268

9 - BATOLO D. and INFERRERA C. : Osservazioni ultrastructural e citochimiche su alcune strutture nucleolari nelle cellule.
Z. Krebsforsch, 1967, 70, 31-38

10 - BEAULATON J. : Étude ultrastructurale et cytochimique des glandes prothoraciques de vers à soie aux quatrième et cinquième âges larvaires. Les cellules sécrétrices.
J.Ultras.Res., 1968, 23, 5-6, 516-536

11 - BAUTZ E.K.E. : Physical properties of messenger RNA of bacteriophage T4.
Proc. Natl. Acad. Sc., 1963, 49, 68

12 - BERERHI A. et MALKANI K. : Cryodécapage des cellules en culture.
J. de Microscopie, 1969, 8, 7, 841-844

13 - BERNHARD W. : Some problems of fine structure in tumor cells.
Progr. Exptl. Tumor Res., 1963, 3, 1-34

14 - BERNHARD W. : Ultrastructural aspects of the normal and pathological nucleolus in mammalian cells.
in "International Symposium : The nucleolus, its structure and function, Bethesda NCI, 1966, 13-38".

15 - BERNHARD W. and GRANBOULAN N. : The fine structure of the cancer cell nucleus.
in "The nucleus of the cancer cell, Proceedings of the American Cancer Society Conference".
Exp. Cell Res., 1963, 9, 19-53 (suppl.)

16 - BERNHARD W., BAUER A., GROPP A., HAGENAU F. and OBERLING C.: L'ultrastructure du nucléole des cellules normales et cancéreuses. Etude en Microscopie Electronique.
Exp. Cell Res., 1955, 9, 88-100

17 - BERNHARD W., FRAYSSINET C., LAFARGE C. and LE BRETON E. : Lésions nucléolaires précoces provoquées par l'Aflatoxine dans les cellules hépatiques de Rat.
Compt. Rend., 1965, 261, 1785-1788

18 - BERNS M.W., OHNUKI Y., ROUNDS D.E., OLSON R.S. : Modification of nucleolar expression following laser microirridiation of chromosomes.
Exp. Cell Res., 1970, 60, 1, 133-138

19 - BIRNSTIEL M., FLEISSNER E. and BORCK K. : Nucleolus : a center of RNA methylation.
Science, 1963, 142, 1572-1600

20 - BISWAS B.B. : The effect of nuclear RNA on nuclear protein synthesis.
Exp. Cell Res., 1963, 32, 1, 177-178

21 - BLASSI V.A. and GYERGYAY F. : A note on inhibition of the ehrlich ascites tumour growth with histones.
Exp. Cell Res., 1965, 38, 2, 424-425

22 - BOREK E. : The methylation of transfert RNA : mechanism and function.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 139

23 - BOUTEILLE M., KHALIFAT R. et DELARUE J. : Etude ultrastructurale de divers types d'inclusions intranucléaires.
J. de Microscopie, 1966, 5, 3, 35a (abstract)

24 - BOUTEILLE M., KALIFAT S.R. and DELARUE J. : Ultrastructural variations of nuclear bodies in human diseases.
J.Ultras.Res., 1967, 19, 5-6, 474-486

25 - BRACHET J. : The role of the cell nucleus in morphogenesis.
in "The cell-nucleus-metabolism § radiosensitivity".
Taylor et Francis LTD, 1 vol., 1966, 4-14

26 - BRENNER S., JACOB F. and MESELSON M. : An instable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis.
Nature, 1961, 190, 576

27 - BRINKLEY B.R. : The fine structure of the nucleolus in mitotic divisions of chinese hamster cells in vitro.
J. Cell Biol., 1965, 27, 2, 411-422

28 - BUSCH H., BYVOET P. and SMETANA K. : The nucleolus of the cancer cell : a review.
Cancer Res., 1963, 23, 313-339

29 - BUSCH H., DESJARDINS R., GROGAN D., HIGASHI K., JACOB T., MURAMATSU M., TAE SUK RO and STEELE W.J. : Composition of nucleoli isolated from mammalian cells.
in "National Cancer Institute, Monograph 23, International Symposium : the nucleolus its structure and function, Bethesda NCI, 1966, 193-212

30 - BUSCH H., DESJARDINS R., HIGASHI K., JACOB T., MURAMATSU M., RO T.S., SMITH S.J., SCHWARTZ S.M. and STEELE W.J.: RNA of nucleoli of Walker tumour and liver cell.
in "The cell nucleus metabolim , § radiosensitivity"
Taylor and Francis LTD, 1 vol., 1966, 181-202

31 - BUSCH H., HODNETT J.L., MORRIS H.P. : P^{32} nucleotide composition of nuclear and nucleolar RNA of Morris hepatomas.
Cancer Res., 1968, 28, 4, 672-683

32 - BUSCH H., HODNETT J.L., MORRIS H.P., NEOGY R. and UNUMA T.: Isolation of nuclei and nucleoli of Morris hepatomas cell.
in "H. BUSCH : Methods in cancer research, 1968, vol. IV, Academic Press, New York

33 - BUSCH H., NARAYAN K.S. and HAMILTON J.: Isolation of nucleoli in a medium containing spermine and magnesium acetate.
Exp. Cell Res., 1967, 47, 1-2, 329-336

34 - BUTLER W.H. and BARNES J.M. : Toxic effects of Groundnut Meal containing Aflatoxin to Rats and Guinea Pigs. Brit. J. Cancer, 1964, 17, 699-710

35 - CASPERSSON T.O. et coll.: Cytochemical study of nucleolus-ribosome system population of normal and neoplastic cells. Exp. Cell Res., 1962, 28, 3, 621-624

36 - CASPERSSON T., FARBER S., FOLEY G.E. and KILLANDER D. : Chemical observations on the nucleolus ribosome system. Exp. Cell Res., 1963, 32, 3, 529-552

37 - CHARRET R. : L'ADN nucléolaire chez Tetrahymena pyriformis chronologie de la réplication. Exp. Cell Res, 1969, 54, 3, 353-361

38 - CHATTERJEE R., BHATTACHARYA B. and CHITTARANJAN de P.: Quantitative differences in protein and nucleic acid concentration of normal and malignant stratified epithelia in their biological phases in µµgm/µ2 of cellular regions. Indian J. Path. Bact., 1968, 11, 2, 106-111

39 - CHOI Y.C., SMETANA K., and BUSCH H. : Studies on a RNA isolated from nucleolar fractions of novikoff hepatoma cells by sequential extractions with dilute and concentrated salt solutions. Exp. Cell Res., 1968, 53, 582-602

40 - CLARK A.M. et coll. : A correlated morphological and functional study of the effects of actinomycin D on HeLa cells. I. Effects on the nucleolar and cytoplasmic ribonucleoproteins. Exp. Cell Res., 1967, 45, 1, 106-119

41 - COWDRY E.V. and PALETTA F.X. : Changes in cellular nuclear and nucleolar sizes during methyl cholanthrene epidermal carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst., 1941, 1, 745-759

42 - CRAWLEY J.C.W. and HARRIS H. : The fine structure of isolated HeLa cell nuclei. Exp. Cell Res., 1963, 31, 1, 70-81

43 - CROSBY LONGWELL and SVIHLA G. : Specific chromosomal control of the nucleolus and of the cytoplasm in wheat. Exp. Cell Res., 1960, 20, 294

44 - DAJOZ R. : Les "puffs" des chromosomes géants. Nature, 1964, 3350, 218

45 - DAS N.K. : Demonstration of a non-RNA nucleolar fraction by silver staining.
Exp. Cell Res., 1962, 26, 428-431

46 - DAS N.K. and ALFERT M. : Detection of a nucleolar component and its behaviour during the mitotic cycle.
Anat. Rec., 1959, 134, 548

47 - DAS N.K. and ALFERT M. : Nucleolar RNA synthesis during mitotic and meiotic prophase.
International Symposium : the nucleolus, its structure and function, Bethesda NCI, 1966, 337-351

48 - DAS N.K., KAUFMANN B.P. and GAY H.: Histone protein transition in Drosophila Melanogaster. III. Changes during early embryonic development.
J. Cell Biol., 1964, 23, 3, 423-430

49 - DAUTA-MENTRE P. : Action des ions calcium et potassium sur la morphologie ultrastructurale des noyaux isolés de Rat.
J. de Microscopie, 1964, 3, 6, 607-626

50 - DE GROUCHY J. : Le message héréditaire.
Gauthier-Villars, 1965

51 - DE MAN J.C.H. et NOORDUYM N.J.A. : Mise en évidence des altérations morphologiques et fonctionnelles effectuées dans les noyaux hépatiques de la Souris par l'actinomycine D.
J. de Microscopie, 1966, 5, 3, 40a (Abstract)

52 - DICKENS F. and JONES H.E.V. : The carcinogenic action of aflatoxins after its subcutanous injection in the rat.
Brit. J. Cancer, 1963, 17, 691-698

53 - DUPRAT A.M. : Effets de températures supra-normales sur le nucléole de cellules embryonnaires d'urodèles en culture in vitro.
Exp. Cell Res., 1969, 57, 1, 37-42

54 - DUPREZ A., BESSOT M., KISSEL P. and FLORENTIN P. : Comparaisons in vivo des incorporations de thymidine et d'uridine tritiées par des tissus humains normaux et cancéreux.
C.R.Soc.Biol., 1968, 162, 2, 505-508

55 - DUPUY-COIN A.M. et coll. : A method of quantitation of nuclear bodies in electron microscopy.
J.Ultras.Res., 1969, 27, 3-4, 244-249

56 - DUTTA C.R., SIEGESMUND K.A. and FOX C.A. : Light and electron microscopic observations of an intranucleolar body in nerve cells.
J. Ultras. Res., 1963, 8, 542-551

57 - ESTABLE C. and SOTELO J.R. : Una nueva estrutur celular : el nucleolonema.
Inst. Inv. Cien. Biol. Publ., 1951, 1, 105-126

58 - FAWCETT D.W. : On the occurence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates.
Am. J. Anat., 1966, 119, 1, 129-145

59 - FEDORKO M.E. and HIRSCH J.G. : Nucleolar fragmentation in L cells exposed to quinacrine in vitro.
Cancer Res., 1969, 29, 918-924.

60 - FELDHERR C.M. : The nuclear annuli as pathways for nucleocytoplasmic exchanges.
J. Cell Biol., 1962, 14, 1, 64-72

61 - FIRKET H. : L'ultrastructure du noyau. Son rôle dans la sécrétion.
Biol. Med., LIII, 6, 620-628

62 - FLICKINGER C.J. : The fine structure of the nucleoli of normal and actinomycin D-treated amoeba proteus.
J. Ultras. Res., 1968, 23, 3-4, 260-271

63 - FLOYD L.R., UMUMA T. and BUSCH H. : Effects of aflatoxin B_1 and other carcinogens Upon nucleolar RNA of various tissues in the Rat.
Exp. Cell Res., 1968, 51, 2-3, 423-438

64 - FRANKLIN R.M. : The inhibition of ribonucleic acid synthesis in mammalian cells by actinomycin D.
Biochem. Biophys. Acta, 1963, 72, 555

65 - FRAYSSINET E., LAFARGE C. et SIMARD R. : Incorporation de thymidine tritiée dans le DNA du foie de Rat. Différence d'activité spécifique entre le DNA nucléolaire total.
Exp. Cell Res., 1968, 49, 1, 40-50

66 - FRENSTER J.H. : Isolation, metabolism and morphology of heterochromatin from interphase lymphocytes.
3d. Ann. Mest. Amer. Soc. for Cell Biol.
J. Cell Biol., 1963, 19, 2, 25a (abstract)

67 - FRENSTER J.H. : Control of ADN strand separations during selective transcription and asynchronous replication. in "The cell nucleus-metabolism, § radiosensitivity" Taylor et Francis LTD, 1 vol., 1966, 27-46

68 - GABE M. : Techniques histologiques. Masson, editeur, 1968

69 - GABRUSEWYCZ-GARCIA N. et KOEHNFELD R.G. : A study of the nucleolar material in sciara coprophilia. J. Cell Biol., 1966, 29, 2, 347-359

70 - GAFFNEY E.V. and NARDONE R.M. : Nucleolar RNA synthesis in synchronous cultures of strain L-929. Exp. Cell Res., 1968, 53, 410-416

71 - GAJDOS A. : Rôle des acides nucléiques. in "Médecine et Biochimie", Masson, 1967, 5-47

72 - GALL J.G. : Electron microscopy of the nuclear envelope. Protoplasmatologica, 1964, 5, 2, 4-25

73 - GALL J.G. : Octogonal nuclear pores. J. Cell Biol., 1967, 32, 2, 391-399

74 - GEORGE P., JOURNEY L.J. and GOLDSTEIN M.N. : Effects of vincristin on the fine structure of HeLa cells during mitosis. J. M.C.I., 1965, 35, 355-375

75 - GEORGIEV G.P. : Metabolism of nuclear RNA fractions. in "The cell nucleus-metabolism, § radiosensitivity" Taylor and Francis, LTD, 1 vol., 1966, 79-85

76 - GEORGIEV G.P. et CHENTSOV J.S. : On the structural organisation of nucleolo-chromosomal ribonucleoproteins. Exp. Cell Res., 1962, 27, 3, 570-572

77 - GEUSKENS M. : Localisation intranucléolaire du RNA marqué par l'uridine ^{3}H, après "chase" et action de l'actinomycine D sur des cellules de rein de Singe en culture. J. de Microscopie, 1966, 5, 3, 53a (abstract)

78 - GEUSKENS M. and BERNHARD W. : Cytochimie ultrastructurale du nucléole. III. Action de l'actinomycine sur le métabolisme du RNA nucléolaire. Exp. Cell Res., 1966, 44, 2-3, 579-598

79 - GILIS E.M. and BAIKIE A.G. : Methods for the demonstration of nucleoli in lymphocytes and other blood cells. J. Clin. Pathol., 1964, 17, 573-574

80 - GILLOT S. : Heterogénéités fonctionnelles dans l'ADN de noyaux géants. Etude autoradiographique sur la glande sericigène de Bombyx Mori L.
Exp. Cell Res., 1968, 50, 2, 388- 402

81 - GOLDBERG I.H., RABINOWITZ M. et REICHE : Basis of actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin.
Proc. Natl. Acad. Sci., 1962, 48, 2094-2101

82 - GOLDSTEIN L. : Combined nuclear transplantation and isotope techniques for the study of nuclear activities.
Protoplasmatologica, 1964, 5, 2, 51-71

83 - GOLDSTEIN L. et RON A. : On the possibility of nuclear protein involvement in the control of DNA synthesis in Amoeba proteus.
Exp. Cell Res., 1969, 55, 1, 144-146

84 - GONZALES S.P. and NARDONE R.M. : Cyclic nucleolar changes during the cell cycle. I. Variations in number, size, morphology and position.
Exp. Cell Res., 1968, 50, 3, 599-615.

85 - GRANBOULAN N. et GRANBOULAN P. : Mise en évidence de chromatine intranucléaire par autoradiographie et cytochimie ultrastructurales.
J. de Microscopie, 1963, 2, 1, 32-33

86 - GRANBOULAN N. et GRANBOULAN P. : Cytochimie ultrastructurale du nucléole. I. Mise en évidence de chromatine à l'intérieur du nucléole.
Exp. Cell Res., 1964, 34, 1, 71-87

87 - GRANBOULAN N. et GRANBOULAN P. : Cytochimie ultrastructurale du nucléole. II. Etude des sites de synthèse de l'ARN dans le nucléole et le noyau.
Exp. Cell Res., 1965, 38, 3, 604-619

88 - GROS F., [illegible] J., TISSIERESA B.S., MICHELSON M., SOFFER A. and LEGAULT L. : Regulation of metabolic breakdown and synthesis of messenger RNA in bacteria.
Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 299

89 - GURDON J.B. and BROWN D.D. : Cytoplasmic regulation of RNA synthesis and nucleolus formation in developing embryos of xenopus laevis.
J. Mol. Biol., 1965, 12, 27-35

90 - HARRIS C., REDDY J. and SVOBODA D. : Isolation and ultrastructure of nucleoli altered in vivo.
Exp. Cell Res., 1968, 51, 2-3, 268-274

91 - HAY E.D. et REVEL J.P. : The fine structure of the DNP component of the nucleus. An electron microscopic study utilizing autoradiography to localize DNA synthesis.
J. Cell Biol., 1963, 16, 1, 29-52

92 - HSU T.C., ARRIGHI F.E., KLEVECZ R.R. and BRINKLEY B.R. : The nucleoli in mitotic divisions of mammalian cells in vitro.
J. Cell Biol., 1965, 26, 2, 539-554

93 - HSU T.C., BRINKLEY B.R. and ARRIGHI F.E. : The structure and behavour of the nucleolus organizers in mammalian cells.
Chromosoma, 1967, 23, 2, 137 - 153

94 - HUANG R.C. and BONNER J. : Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci., 1962, 48, 1216

95 - HYDE B.B., NARAYAN S.K. and BIRNSTIEL M.L. : Observatiions on fine structure in Pea nucleoli in situ and isolated.
J. Ultras. Res., 1965, 12, 5-6, 652-667

96 - IZAWA M. and KAWASHIMA K. : Some properties of ribonucleoproteins particles in the isolated nucleoli of mouse tumor cells.
Biochem. Biophys. Acta., 1969, 174, 1, 124-134

97 - IZAWA M. and KAWASHIMA K. : RNA synthesis in the nucleoli of mouse ascites tumor cells in relation to nucleolar components.
Biochem. Biophys. Acta, 1968, 155, 1, 51-62

98 - IZARD J. et BERNHARD W. : Analyse ultrastructurale de l'argentophilie du nucléole.
J. de Microscopie, 1962, 1, 6, 421-434

99 - JACOB J. : An electron microscope autoradiographic study of the site of initial synthesis of RNA in the nucleolus of smittia.
Exp. Cell Res., 1967, 48, 2, 276-282

100 - JACOB J. : Involvement of the nucleolus in viral synthesis in the cells of primary renal tumors of leopard frogs.
Cancer Res., 1968, 28, 2126-2136

101 - JACOB J. : Changes in nuclear ultrastructure during amphibian development.
Exp. Cell Res., 1969, 54, 2, 281-286

102 - JACOB F. and MONOD J. : Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of protein.
J. Mol. Biol., 1961, 3, 318

103 - JACOB J. and SIRLIN J.L. : Electron microscope studies on salivary gland cells . I. The nucleus of bradysia mycorum frey (sciaridae), with special reference to the nucleolus.
J. Cell biol., 1963, 17, 1, 153-165

104 - JACOB J. and SIRLIN J.L. : Electron microscope studies on salivary gland cells. IV. The nucleus of smittia parthenogenetica (chironomidae) with special reference to the nucleolus and the effects of actinomycin there on.
J. Ultras. Res., 1964, 11, 3-4, 315-328

105 - JEZEQUEL A.M. et BERNHARD W. : Modifications ultrastructurales du pancréas exocrine de Rat sous l'effet de l'actinomycine D.
J. de Microscopie, 1964, 3, 3, 279-296

106 - JONES K.W. : The role of the nucleolus in the formation of ribosomes.
J. Ultras. Res., 1965, 13, 3-4, 257-262

107 - JOURNEY L.J. et GOLSTEIN M.N. : Electron microscope studies on HeLa cell lines sensitive and resistant to actinomycin D.
Cancer Res., 1961, 21, 929-932

108 - KALIFAT S.R., BOUTEILLE M. et DELARUE J. : Etude ultrastructurale de la lamelle observée au contact de la membrane nucléaire interne.
J. de Microscopie, 1967, 6, 4, 64a

109 - KALNINS V.I., STICH H.F. and BANCROFT J.A. : Fine structure of the nucleolar organizer of salivary gland chromosome of chironomidae.
J. Ultras. Res., 1964, 11, 3-4, 282-291

110 - KARARASAKI S. : An electron microscope study on neoplastic transformation in rat liver parenchyma.
Proc.,Ann. Ass.,Cancer Res., 1967, 8, 35

111 - KARASAKI S. : The ultrastructure and RNA metabolism of nucleoli in early sea urchin embryos.
Exp. Cell Res., 1968, 52, 1, 13-26

112 - KAUFMANN E. et coll. : Isolation of different-sized nucleoli from normal and regenerating rat liver.
Exp. Cell Res., 1968, 49, 1, 215-218

113 - KESSEL R.G. : An electron microscope study of [illegible] nuclear-cytoplasmic exchange in oocytes of Ciona intestinalis.
J. Ultras. Res., 1966, 15, 1-2, 181-195

114 - KIERSZENBAUM A.L. : Relationship between nucleolus and nuclear bodies in human mixed salivary tumors.
J. Ultras. Res., 1969, 29, 5-6, 459-469

115 - KOPAC M.J. and MATEYKO G.M. : Nucleolar chromosomes : structures, interactions and perspectives.
Advances Cancer Res., 1964, 8, 121-190

116 - KOULISH S. and KLEINFELD R.G. : The rôle of the nucleolus. I Tritiated cytidine activity in liver parenchymal cells of thioacetamide-treated rats.
J. Cell Biol., 1964, 23, 1, 39-51

117 - KRISHAN A. : Fine structure of the kinetochores in vinblastine sulfate-treated cells.
J. Ultras. Res., 1968, 23, 1-2, 134-143

118 - KRISHAN A. et coll. : Nuclear bodies, a component of cell nuclei in hamster tissues and human tumors.
J. Ultras. Res., 1967, 19, 573-595

119 - KRISTIN H. and PETTS V. : Nuclear bodies in human thymus.
J. Ultras. Res., 1969, 27, 3-4, 330-343

120 - LAFARGE C., FRAYSSINET C. et SIMARD R. : Inhibition préférentielle des synthèses de l'ARN nucléolaire provoquée par l'aflatoxine dans les cellules hépatiques du Rat.
C.R.Acad. Sc., 1966, 263, 1011-1014

121 - LAFONTAINE J.G. : Structure and mode of formation of the nucleolus in meristematic cells of vicia faba and allium cepa.
J. Biophysic. Biochem. Cytol., 1958, 4, 777-784

122 - LAFONTAINE J.G. and CHOUINARD L.A. : A correlated light and electron microscope study, the nucleolar material during mitosis in vicia faba.
J. Cell Biol., 1963, 17, 1, 157-202

123 - LAPIS K. and BERNHARD W.: The effect of mitomycine C on the nucleolar fine structure of KB cells in cell culture.
Cancer Res., 1965, 25, 628-645

124 - LE BUIS : Altérations ultrastructurales nucléaires et nucléolaires de cellules Kb infectées par l'adénovirus type 12.
J. de Microscopie, 1966, 5, 3, 59a (abstract)

125 - LEPIUS R., DEBRAY J., PINET J. et BERNHARD W. : Lésions nucléaires décelées au ME dans les cellules des lymphomes malins chez l'homme.
C.R.Acad. Sc., 1961, 253, 2788-2790

126 - LIAN M.C., HUILEGA L.S. and HULBERT R. : Regulation of RNA synthesis in isolated nucleoli by histones and nuclear proteins
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 1965, 53, 626
Pathol. et Biol., 1966, 14, 1-2, 137 (Abstract)

127 - LOVE R. : Differences in the internal structure of nucleoli of diploïd and non-diploid transformed neoplastic cells in vitro.
Exp. Cell Res., 1965, 40, 1, 188-192

128 - LOVE R. : Anisonucleolinosis in mammalian cell cultures. in "International Symposium : the nucleolus, its structure and function", Bethesda NCI, 1966, 107-124

129 - LOVE R. and WALSH R.J. : The relation of nucleolini to nucleolar vacuoles in the living cell.
Exp. Cell Res., 1968, 53, 432-446

130 - LUDFORD R.J. : Nuclear structure and its modifications in tumours.
Brit. J. Cancer, 1954, 8, 112-131

131 - MAC CONKEY E.H. and HOPKINS J. W. : The relationships of the nucleolus to the synthesis of RNA in HeLa cells.
Proc. Natl. Acad. Sci., 1964, 51, 1197-1204

132 - MAC LEISH J. : Chemical and autoradiographic studies of intranucleolar DNA in vicia faba.
Exp. Cell Res., 1968, 51, 1, 157-166

133 - MAC RAE E.K. : Organized structures in the nucleolus.
J. Cell Biol., 1964, 23, 1, 195-199

134 - MAGGIO R., SIEKEVITZ P., PALADE and GEORGE E. : Studies on isolated nuclei. I. Isolation and chemical characterization of nuclear fraction from guinea pig liver.
J. Cell Biol., 1963, 18, 2, 267-292

135 - MAGGIO R., SIEKEVITZ P. and GEORGE E. : Studies on isolated nuclei. II. Isolation and chemical characterization of nucleolar and nucleoplasmic subfractions.
J. Cell Biol., 1963, 18, 2, 293-312

136 - MARINOZZI V. : Cytochimie ultrastructurale du nucléole.
J. de Microscopie, 1963, 2, 1, 36-37

137 - MARINOZZI V. : Cytochimie ultrastructurale du nucléole - ARN et protéines intranucléolaires.
J. Ultras. Res., 1964, 10, 5-6, 433-456

138 - MARINOZZI V. et BERNHARD W. : Présence dans le nucléole de deux types de ribonucléoprotéines morphologiquement distinctes.
Exp. Cell Res., 1963, 32, 3, 595-598

139 - MAZANEC K. : Présence de la "zonula nucleum limitans" dans quelques cellules humaines.
J. de Microscopie, 1967, 6, 7, 1027-1032

140 - MENTRE P. : Spécificité de la localisation des acides nucléiques in situ par la ribonucléase.
J. de Microscopie, 1968, 7, 5, 653-672

141 - MENTRE P. : Présence d'acide ribonucléique dans l'anneau osmiophile et le granule central des pores nucléaires.
J. de Microscopie, 1969, 8, 1, 51-68

142 - MILLER O.L. and BEATY B.R. : Visualization of nucleolar genes.
Science, 1969, 164, 3882, 955-957

143 - MIRONESCU S. and DRAGOMIR C. : Nucleolar number variations in rat liver cells after partial hepatectomy.
Exp. Cell Res., 1966, 43, 217-220

144 - MIRONESCU S. and DRAGOMIR C. : Nucleolar behaviour in regenerating liver of normal and whole-irradiated rats.
Cancer Res., 1967, 27, 10, 1, 1819-1830

145 - MIRONESCU S., ENCUT I., MIRONESCU K. and LICIN F. : Nucleolar behaviour in regenerating liver of rats receiving intra-abdominal injections of azo-dyes and thioacetamide.
J. N. C. I., 1968, 40, 5, 917-934

146 - MIRONESCU S. et coll. : Nucleolar and mitotic abnormalities produced by thioacetamide and hydrocortisone in monkey cells cultivated in vitro.
Exp. Cell Res., 1969, 57, 3-5, 193-20[illegible]

147 - MITCHISON J.M. : Some functions of the nucleus.
Int. Rev. Cytol., 1966, 19, 97-110

148 - MONNERON A. : Utilisation de la pronase en cytochimie ultrastructurale.
J. de Microscopie, 1966, 5, 5, 583-596

149 - MONNERON A. and BERNHARD W. : Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells.
J. Ultras. Res., 1969, 27, 3-4, 266-288

150 - MONNERON A. et MOULE Y. : Etude ultrastructurale de particules ribonucléoprotéiques nucléaires isolées à partir du foie de rat.
Exp. Cell Res., 1968, 51, 2-3, 531-554

151 - MONTGOMERY P.O.B., REYNOLDS R.C. and COOK J.E. : "nucleolar caps" induced by flying spot ultraviolet nuclear irradiation.
Am. J. Path., 1966, 49, 3, 555-568

152 - MONERO G. et VINZENS F. : Effets de la microirradiation ultra-violette sur différentes parties de la cellule. I. Etude en microscopie électronique sur les coupes en série transversales et sagittales.
Exp. Cell Res., 1969, 56, 1, 75-85

153 - MURAMATSU M. and BUSCH H. : Studies on nucleolar RNA of the Walker 256 carcinosarcoma and the liver of the Rat.
Cancer Res., 1964, 24, 1028-1034

154 - MURAMATSU M. and BUSCH H. : Studies on the nuclear and nucleolar ribonucleic acid of regenerating rat liver.
J. Biol. Chem., 1965, 240, 3960-3966

155 - MURAMATSU M. and BUSCH H. : Isolation, composition and function of tumors and other tissues.
in "BUSCH H. : Methods in cancer research", vol. II, chapitre IX, 303-359, Academic Press, New York, 1967

156 - MURAMATSU M., HIGASHINAKAGAWA T., ONO T. et SUGANO H. : The nucleolar RNA of minimal deviation hepatomas.
Cancer Res., 1968, 28, 1126-1157

157 - MURAMATSU M., UTAKOJI T. and SUGANO H. : Rapidly-labelled nuclear RNA in chinese hamster testis.
Exp. Cell Res., 1968, 53, 1, 278-282

158 - NADAL C. : Polyploïdie hépatique du Rat. III. Etude des nucléoles des cellules hépatiques du Rat normal.
Exp. Cell Res., 1967, 48, 3, 507-517

159 - NADAL C. et ZAJDELA F. : Polyploïdie hépatique du Rat. IV. Variations expérimentales du volume nucléolaire des hépatocytes et leur mécanismes de régulation.
Exp. Cell Res., 1967, 48, 3, 518-528

160 - NAKAMURA T., RAPP F. and BUSCH H. : Common features of the base composition of rapidly labeled RNA of nucleoli in a number of experimental tumors.
Cancer Res., 1967, 27, 1084-1091

161 - NARAYAN K.S. et coll. : Ultrastructural aspects of the ribonucleoprotein network in nuclei of walker tumor and rat liver.
Exp. Cell Res., 1967, 46, 1, 65-78

162 - NARAYAN K.S. and HYDE B.B. : Ultrastructural studies of a nuclear body in peas with characteristics of both chromatin and nucleoli.
J. Ultras. Res., 1965, 12, 5-6, 748-761

163 - NARAYAN K., MURAMATSU K., MURAMATSU M., SMETANA K. and BUSCH H. : Ultrastructural studies on RNA and DNA components of isolated nucleoli of Walker 256 carcinosarcoma.
Exp. Cell Res., 1966, 41, 1, 81-98

164 - NARAYAN K., STEELE W.J. and BUSCH H. : Evidence that the granular and fibrillar components of nucleoli contain 28 and 6 S RNA respectively.
Exp. Cell Res., 1966, 42, 483-492

165 - NEIDLE A. and WALESH H. : Histones : species and tissue specificity.
Sciences, 1964, 145. 1059

166 - OHNO S., WEILER C. and STENIUS C. : Adormant nucleolus organizer in the guinea pig, cavia cobaya.
Exp. Cell Res., 1961, 25, 498-503

167 - PATRIZI G. and POGER M. : The ultrastructure of the nuclear periphery the "zonula nucleum limitans".
J. Ultras. Res., 1967, 17, 1-2, 127-136

168 - PAVELETZ N., SIEBS and LETTRE R. : Untersuchungen zur argentaffinreaktion des nukleolus.
Z.Zellf., 1967, 76, 4, 577-605

169 - PERRY R.P. : Rôle of the nucleolus in ribonucleic acid metabolism and other cellular processes.
Nat. Cancer Inst., 1964, 14, 73-89

170 - PETERSEN G.B. and THERKELSEN A.J. : Number of nucleoli in female and male human cells in tissue culture.
Exp. Cell Res., 1962, 28, 590-592

171 - POIRIER J. : L'ultrastructure du nucléole.
Presse Médicale, 1967, 75, 48, 2455-2456

172 - POLICARD A. : Le nucléole, cet inconnu.
Presse Médicale, 1967, 75, 48, 2431

173 - POPOFF N. and STEWART S. : The fine structure of nuclear inclusions in the brain of experimental golden hamster.
J. Ultras. Res., 1968, 23, 5-6, 347-361

174 - PRESCOTT D.M. and BENDER M.A. : Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells.
Exp. Cell Res., 1962, 26, 2, 260-268

175 - PRIEST J.H., HEADY J.E. and PRIEST R.E. : Delayed ouset of replication of human X chromosomes.
J. Cell Biol., 1967, 35, 483-487

176 - RATTENBURY J.A. and SERRA J.A. : Types of nucleolus reconstitution in telophase and the question of the "nucleolar organizer".
Pr. Acta. Biol., 1952, 2, séries A, 259

177 - RICHER L. et coll. : The fine structure of the nucleolar constituent.
J. Ultras. Res., 1969, 29, 1-2, 1-14

178 - REDDY J. and SVOBODA D. : The relationship of nucleolar segregation to ribonucleic acid synthesis following the administration of selected hepatocarcinogens.
Lab. Invest., 1968, 19, 1, 132-145

179 - REICH E. : Actinomycin. Correlation of structure and function of its complexes with purines and DNA.
Sciences, 1964, 143, 684-689

180 - REYNOLDS R.C. and MONTGOMERY P.O.B. : Nucleolar "caps" procuced by the carcinogenic agent 4-nitro-quinoline N-oxide.
Proc. Am. Ass. Cancer Res., 1962, 3, 354

181 - REYNOLDS R.C. and MONTGOMERY P.O.B. : Nucleolar pathology produced by acridine orange and proflavine.
Am. J. Path., 1967, 51, 3, 323-339

182 - REYNOLDS R.C., MONTGOMERY P.O.B. and HUGHES B. : "Nucleolar caps" produced by actinomycin D.
Proc. Am. Ass. Cancer Res., 1963, 4, 57

183 - RICH A., WARNER J.R. and GOODMAN H.M. : The structure and function of polyribosomes.
Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 269

184 - RITCHIE R.F. : Nucleolar structure by immunologic technics.
Cancer Res., 1969, 29, 267-269

185 - RODRIGUEZ T.G. : Ultrastructural changes in the Mouse exocrine pancreas induced by prolonged treatment with actinomycin D.
J. Ultras. Res., 1967, 19, 1-2, 116-129

186 - ROELS H. : Etude de l'intensité de la réaction de FEULGEN dans le noyau de la cellule thyroïdienne chez le rat blanc.
Exp. Cell Res., 1955, 40, 3, 499-512

187 - ROELS H. : "Métabolic" DNA, a cytochimical study.
Int. Rev. Cytol., 1956, 19, 1-34

188 - ROODYN D.B. : A survey of metabolic studies on isolated Mammalian nuclei.
Int. Rev. Cytol., 1959, 8, 279-307

189 - SALSBURY A.J. : Nucleolar staining in the differentiation of acute leukaemias.
Brit. J. Haemat., 1957, 12, 3, 765-772

190 - SANCHEZ S. : Effets de l'actinomycine D sur les constituants cellulaires et le métabolisme de l'ARN de l'ovocyte d'oursin (Paracentrotus lividus).
Exp. Cell Res., 1966, 44, 1, 19-31

190 - SUHINOZUKA H., GOLDBALTT P.J. and FARBER E. : The disorganisation of hepatic cell nucleoli induced by ethionine and its reversal by adenine.
J. Cell Biol., 1966, 32, 515-528

192 - SCHOEFL G.I. : The effect of actinomycin D on the fine structure of the nucleolus.
J. Ultras. Res., 1964, 10, 3-4, 224-243

193 - SCHWEIZER E. et HALVORSON H.O. : On the regulation of ribosomal RNA synthesis in yeast.
Exp. Cell Res., 1969, 56, 2-3, 239-244

194 - SCOTT R.B. and BELL E. : Protein synthesis during development, control trough messenger RNA.
Sciences, 1964, 145, 711

195 - SEED J. : The relations between DNA, RNA and protein in normal embryonic cell nuclei and spontaneous tumor cell nuclei.
J. Cell Biol., 1964, 20, 1, 17-24

196 - SEED J. : The synthesis of DNA, RNA and nuclear protein in normal and tumor strain cells. I. Fresh embryo human cells.
J. Cell Biol., 1966, 28, 233-248

197 - SEED J. : The synthesis of DNA, RNA and nuclear protein in normal and tumor strain cells. II. Fresh embryo mouse cells.
J. Cell Biol., 1966, 28, 249-256

198 - SEITE R. : Etude ultrastructurale de divers types d'inclusions nucléaires dans les neurones sympathiques du Chat.
J. Ultras. Res., 1970, 30, 1-2, 152-165

199 - SEITE R., BRUNET M. et DURAND S. : Effets de l'actinomycine D sur les neurones des ganglions cervical supérieur et plexiforme du Rat et sur leur activité élaboratrice.
C.R. Soc. Biol., 1966, 160, 5, 1011-1014

200 - SHAPIRO I.M. and LEVINA L.Y. : Autoradiographic study on the time of nuclear protein synthesis in human leucocyte blood culture.
Exp. Cell Res., 1967, 47, 1-2, 75-85

201 - SIEBERT G. : Energy yielding reactions in nuclei.
in "The cell nucleus-metabolism, § radiosensitivity"
Taylor et Francis LTD, 1966, 1 vol., 265-272

202 - SIMARD R. et DUPRAT A.M. : Action de l'actinomycine D sur les ribunucléoprotéines nucléaires de cellules d'amphibiens en différenciation.
J. Ultras. Res., 1969, 29, 1-2, 60-75

203 - SINNHUBER R.O., WALES J.L. and al. : Dietary factors and hepatoma in rainbow trout (salmo gairdueri). I. Aflatoxins in vegetable protein feedstuffs.
J. Nat. Cancer Inst., 1968, 41, 3, 711-718

204 - SIRLIN J.L., JACOB J. and KATO K.I. : The relation of messenger to nucleolar RNA.
Exp. Cell Res., 1962, 27, 2, 355-358

205 - SIRLIN J.L., TANDLER C.J. and JACOB J. : The relationships between the nucleolus organizer and nucleolar RNA.
Exp. Cell Res., 1963, 31, 3, 611-614

206 - SLIMANE-TALEB S. : Cours de cytologie générale, 1968

207 - SMETANA K., FREIREICH E.J. and BUSCH H. : Chromatin structures in ring-shaped nucleoli of human lymphocytes.
Exp. Cell Res., 1968, 52, 1, 112-128

208 - SMETANA K., NARAYAN K.S. and BUSCH H. : Quantitative analysis of ultrastructural components of nucleoli of the Walker tumor and liver.
Cancer Res., 1966, 26, 786-796

209 - SMETANA K. and POTHESIL M. : Rings shaped nucleoli in liver cells of rats after treatment with actinomycin D.
Z.Zellf., 1968, 92, 62, 69.

210 - SMETANA K., STEELE W.J. and BUSCH H. : A nuclear ribonucleoprotein network.
Exp. Cell Res., 1963, 31, 1, 198-201

211 - SMETANA K., UNUMA T. and BUSCH H. : Ultrastructural studies on nucleic acids of nucleolar granular components in novikoff hepatoma cells.
Exp. Cell Res., 1968, 51, 1, 105-122

212 - SMITH W.J. : Effects of ribonuclease on nuclear ultrastructure in larval Drosophila salivary glands.
J. Ultras. Res., 1969, 27, 1-2, 168-181

213 - SMITH S.J., HIGASHI K. and BUSCH H. : Studies on nucleolar RNA fractions of the Walker and Novikoff tumors.
Cancer Res., 1967, 27, 849-854

214 - STAHELIN F., WETTSTEIN F.O., NOLL H. : Breakdown of rat-liver ergosomes in vivo after actinomycin inhibition of m-RNA synthesis.
Sciences, 1963, 140, 180-183

215 - STEINERT M., VAN ASSEL S. et STEINERT G. : Etude par autoradiographie, des effets du bromure d'éthidium sur la synthèse des acides nucléiques de crithidia luciliae.
Exp. Cell Res., 1969, 56, 1, 69-74

216 - STENRAM U. : Nucleolar size in the liver of rats fed on high and non protein diets after starvation.
Acta Anat., 1956, 26, 352-361

217 - STENRAM U. : Nucleolar size in the liver of rats fed diets deficient in essential amino-acids.
Acta Path. Microbiol. Scan., 1956, 28, 364-374

218 - STENRAM U. : The volume and RNA concentration of nucleoli in liver and hepatoma cells of Rats fed on high and non protein diet.
Acta Path. Microbiol. Scan., 1958, 44, 239-246

219 - STENRAM U. : Radio autographic RNA and protein labeling and the nucleolar volume in rats following administration of moderate doses of actinomycin D.
Exp. Cell Res., 1964, 36, 2, 242-255

220 - STENRAM U. : Autoradiographic, biochemical and ultrastructural studies into the effect of actinomycin 5-fluorouracil and adénosine on nucleolar and cellular structure and function.
in "International Symposium : the nucleolus, its structure and function" Bethesda NCI, 1966, 379-392

221 - STEVENS B.J. : The effect of actinomycin D on nucleolar and nuclear fine structure in the salivary gland of chironomus thumni.
J. Ultras. Res., 1964, 11, 3-4, 329-353

222 - STEVENS B.J. : The fine structure of the nucleolus during mitosis in the grasshopper neuroblast cell.
J. Cell Biol., 1965, 24, 3, 349-368

223 - STEVENS B.J. and SWIFT H. : RNA transport from nucleus to cytoplasm in chironomus salivary glands.
J. Cell Biol., 1966, 31, 1, 57-77

224 - STOWEL R.E. : The relationships of nucleolar mass to protein synthesis.
Exp. Cell Res., 1963, 9, 164-169 (suppl.)

225 - SUSKIND R.G. : Autoradiographic and cytochemical evidence for synthesis of a lysine-containing ribonucleoprotein in nucleoli inhibed by actinomycin D.
J. Cell Biol., 1965, 24, 309-313

226 - SUTER E.R. and SALOMON J.C. : Effets de l'actinomycine D sur la structure fine du nucleole des hépatocytes de rats intoxiqués par la thiocétamide.
Exp. Cell Res., 1966, 43, 1, 248-251

227 - SWIFT H. : Nucleoprotein localization in electron micrographs : meta-1 binding and autoradiography.
in "The interpretation of ultrastructure" HARRIS R.J.C., Academic Press, 1962, 213-232

228 - SWIFT H. : Cytochemical studies on nuclear fine structure.
Exp. Cell Res., 1963, suppl. 9, 54-67

229 - TADAO UNUMA: Electron microscopic cytochemistry of the nucleus and the nucleolus.
J. Electron Microsc., 1969, 18, 1, 25-34

230 - TANDLER C.J. : Detection and origin of nucleolar components a model for nucleolar RNA function.
in International Symposium : The nucleolus, its structure and function" Bethesda NCI, 1966, 181-192

231 - TANDLER C.J. : The silver-reducing property of the nucleolus and the formation of pronucleolar material during mitosis.
Exp. Cell Res., 1959, 17, 560

232 - THOENES W. : Fett in nucleolus.
J. Ultras. Res., 1964, 10, 3-4, 194-206

233 - UNUMA T., ARENDELL J.P. and BUSCH H. : High resolution autoradiographic studies of the uptake of 3H-5-uridine into condensed and dispersed chromatin of nuclei and granular and fibrillar components of nucleoli of Novikoff hepatoma ascites cells.
Exp. Cell Res., 1968, 52, 2-3, 429-438

234 - UNUMA T. and BUSCH H. : Formation of microspherules in nucleoli of tumor cells treated with high doses of actinomycin D.
Cancer Res., 1967, 27, 1232-1242

235 - UNUMA T., FLOYD L.R. and BUSCH H. : Selective removal of the perinucleolar nucleolus-associated chromatin from the isolated nucleoli of livers of thio-acetamide-treated rats.
Exp. Cell Res., 1968, 52, 1, 101-111

236 - UNUMMA T., MORRIS H.P. and BUSCH H. : Comparative studies of the nucleoli of Morris hepatomas, embryonic liver and Aflatoxin B1-treated liver of rats.
Cancer Res., 1967, 27, 11, 1, 2221-2233

237 - UNUMA T., SMETANA K. and BUSCH H. : A morphologic study on the chromatin areas associated with the nucleolus.
Exp. Cell Res., 1967, 48, 3, 665-670

238 - VAN CAMP G.M. : Le rôle du nucléole dans la caryocinèse somatique.
Cellule, 1924, 34, 5-49

239 - VASQUEZ C. et PAVLOVSKY A. : Etude au M.E. des altérations nucléaires et nucléolaires dans les lymphomes malins chez l'Homme.
J. de Microscopie, 1964, 2, 1, 56-57

240 - VENDRELY R. et PICAUD M. : Etude comparée des histones d'érythrocytes de différentes espèces animales.
Exp. Cell Res., 1968, 49, 1, 13-24

241 - VIVIER E. : Observations ultrastructurales sur l'enveloppe nucléaire et ses pores chez des sporozoaires.
J. de Microscopie, 1967, 6, 3, 371-390

242 - VORBRODT A. et BERNHARD W. : Essais de localisation au M.E. de l'activité phosphatasique nucleaire dans des coupes à congélation ultrafines.
J. de Microscopie, 1968, 7, 2, 195-204

243 - VOROBYEV V.I. and coll. : The effect of histones on the early embryogenesis of sea urchins.
Exp. Cell Res., 1969, 55, 2, 171-175

244 - WANG T.Y. : Diametric effects of histones and the non-histones proteins on DNA replication in vitro.
Exp. Cell Res., 1969, 57, 2-3, 467-469

245 - WINTZERITH M., ITTEL M.E. and MANDEL P. : The incorporation of radioactive precursors into the chromosomal, nucleolar and mitochondrial DNA of the normal liver and of the liver in the process of cancerization.
Bull. Soc. Chimie Biol. (Paris), 1968, 50, 2,451-461

246 - WISCHNITZER S. : The ultrastructure of the nucleus and nucleocytoplasmic relations.
Int. Rev. Cytol., 1966, 19, 157-162

247 - WISCHNITZER S. : Current techniques in biochemical electron microscopy.
Int. Rev. Cytol., 1967, 22, 1-61

248 - YASUZUMI G. et coll. : Fine structure of nuclei as revealed by electron microscopy. V. Intranuclear inclusion bodies in hepatic parenchymal cells in cases of serum hepatitis.
J. Ultras. Res., 1968, 23, 3-4, 321-332

249 - YASUZUMI G. et TSUBO L. : The fine structure of nuclei as revealed by electron microscopy. III. Adenosine triplosphatase activity in the pores of nuclear envelope of Mouse choroïd plexus epithelial cells.
Exp. Cell Res., 1966, 43, 2, 281-292

250 - YASUZUMI G. and SUGIHARA R. : The fine structure of nuclei as revealed by electron microscopy. II. The process of nucleolus reconstitution in Ehrlich ascites tumor cells nuclei.
Exp. Cell Res., 1965, 40, 1, 49-55

251 - YASUZUMI G. and SUGIHARA R. : The fine structure of nuclei as revealed by electron microscopy. I. The fine structure of ehrlich ascites tumor cell nuclei in preprophase.
Exp. Cell Res., 1965, 37, 1, 207-229

252 - ZBARSKY I.B., MITRIEVA N.P. and YERMOLAYEVA L.D. : On the structure of tumor cell nuclei.
Exp. Cell Res., 1962, 27, 3, 573-576

253 - ZAJDELA F. : Acquisitions récentes sur le rôle du noyau dans les cellules somatiques.
IIIe Revue Franç. Hématol., 1961, 1, 3, 381-388.

o

o o